

# ANNALES

## DE

# L'INSTITUT PASTEUR

### RECHERCHES SUR LA PRÉSENCE GÉNÉRALE ET SUR LE RÔLE PROBABLE DU SODIUM DANS LES PLANTES

par GABRIEL BERTRAND.

(*Institut Pasteur.*)

A l'époque où je me suis occupé de la présence des métaux alcalins dans les espèces vivantes (1), les chimistes et les physiologistes étaient à peu près d'accord pour considérer le potassium comme indispensable à la vie des plantes. On n'avait publié qu'une observation contraire à cette fondamentale conception : celle de Grandeau, d'après qui « il n'y avait pas trace de potasse dans les cendres de la canne à sucre, ni du fucus » [1].

Quant au sodium, il en était tout autrement. Même longtemps après la découverte de ce métal alcalin dans certaines plantes du bord de la mer par Duhamel de Monceau, dans la première moitié du XVIII<sup>e</sup> siècle [2], on ignorait si le sodium existe, comme le potassium, d'une manière constante dans les tissus des végétaux. Tout au plus semblait-on admettre, en se basant sur les analogies physico-chimiques des deux métaux, que ceux-ci pouvaient se rencontrer dans les espèces végétales et y remplir, sans préciser davantage, à peu près les mêmes fonctions. Les premiers observateurs qui essayèrent de s'assurer du fait par l'analyse chimique des cendres, ne disposant que de méthodes imparfaites, arrivèrent à des conclusions divergentes sur les proportions et même sur la présence du sodium dans les plantes.

Frappé par l'importance de la question, Péligot réagit, en 1867,

(1) Lorsque j'ai été chargé du Cours de Chimie biologique à la Faculté des Sciences de Paris (1905).

contre la manière dont on l'avait traitée jusqu'alors. S'élevant contre l'emploi des méthodes indirectes pour la détermination du sodium et n'admettant la présence de ce métal dans une cendre végétale que lorsqu'elle y avait été directement démontrée, notamment par la cristallisation différente et très caractéristique des deux sulfates alcalins, il est arrivé à la conclusion « que la cendre fournie par l'incinération de la plupart des végétaux est exempte de sodium ». Sur les 20 espèces qu'il énumère, il n'a caractérisé le sodium que dans 5, soit une fois sur quatre seulement [3].

La méthode de Péligot donnait des résultats qualitatifs certains lorsqu'il y avait une proportion suffisante de sodium, mais elle n'était pas assez sensible pour déceler de petites quantités du même métal en présence de beaucoup de potassium, ce qui, nous le savons aujourd'hui, est généralement le cas. Au point de vue quantitatif, la méthode était pour ainsi dire sans valeur.

Conduit à me préoccuper de la présence, ne serait-ce qu'en très petites proportions, des divers éléments de la matière vivante, j'ai repris à mon tour l'étude biochimique du sodium. Je me suis préoccupé tout d'abord d'établir une méthode de séparation précise du sodium et du potassium qui peuvent exister dans les organismes. Cette méthode, mettant à profit les progrès réalisés dans l'analyse chimique, fut trouvée en amenant tout d'abord les métaux alcalins à l'état de chlorures aussi exempts que possible de tous autres éléments ; puis en précipitant le potassium par le bichlorure de platine ou par l'acide perchlorique, et séparant enfin le sodium sous la forme de chlorure ou, mieux, d'acétate triple de Streng [4]. Cette méthode a été utilisée dans mon laboratoire par P. Gérard pour la préparation de sa thèse de doctorat ès sciences naturelles de la Faculté des Sciences de Paris : « Contribution à l'étude du potassium et du sodium chez les Animaux » (Paris, 1912). J'en ai fait plus tard une description séparée [5].

Cette méthode fut ensuite appliquée par moi, en collaboration avec J. Perietzeanu [6] et avec M. Rosenblatt [7], à l'examen de plus d'une centaine d'échantillons de plantes ou de parties de plantes : marines, submarines ou terrestres, sauvages ou cultivées, appartenant à 73 espèces différentes [61 phanérogames et 12 cryptogames] (2).

Les résultats de ces recherches démontrèrent que le sodium existait en proportions dosables dans toutes les espèces végétales et dans toutes les parties des espèces végétales analysées.

Comme les espèces examinées comportaient intentionnellement

(2) Ces dernières publications ont été rassemblées et reproduites récemment en une petite brochure par la Société commerciale des Nitrates du Chili, Paris.



celles qui avaient été signalées par Pélilot comme exemptes de sodium, on voit que les derniers résultats étaient, contrairement à ce que l'on croyait alors, complètement en faveur de la présence générale du sodium, comme du potassium, dans le règne végétal.

Sans faire la moindre allusion aux publications ci-dessus, A. Wallace a réalisé dernièrement, en collaboration avec S. J. Toth et F. E. Bear [8], une ample série de dosages du sodium et du potassium dans les plantes du territoire de New-Jersey. Ils utilisèrent, pour cela, le spectrophotomètre à flamme, modèle 18 de Perkin-Elmer, appareil avec lequel ils exécutèrent d'une manière simple et rapide leurs analyses. Plus de 300 échantillons de plantes ou de parties de plantes (surtout des feuilles, mais aussi des racines, des tiges, des fruits et des graines), provenant de 77 espèces de plantes sauvages et de 24 variétés de plantes cultivées, ont été examinés par eux pour les métaux alcalins. Le potassium fut rencontré dans tous les cas, de 2,3 g (sommité complète de *Spartina patens*) à 88,8 g (sommité d'Epinard, var. Savoy) par kilogramme de matière sèche.

Il en fut différemment pour le sodium : 11 échantillons n'accusèrent pas sa présence. Voici la liste de ces exceptions :

SOMMITÉS COMPLÈTES :

*Poa pratensis*.  
Carotte sauvage.  
*A. el-pias rubra*.  
*Chenopodium album*.  
*Plantago lanceolata*.  
*Achillea millefolium*.

PAILLE :

Froment.

FEUILLES :

*Oxycoccus oxycoccus*.  
*Gaylussacia resinosa*.

GRAINES :

Haricot de Lima.  
Pois ordinaire.

Dans les autres échantillons, la teneur en sodium fut de 0,1 g à 20,4 g dans les plantes sauvages et de 0,1 g à 30 g dans les plantes cultivées.

Bien que les auteurs américains aient mentionné, au début de leur mémoire, que l'on n'est pas certain, jusqu'ici, que le sodium possède une fonction nutritive quelconque dans les plantes, ils n'ont émis aucune opinion au sujet des 11 résultats négatifs qu'ils ont obtenus. Il n'est donc pas possible de savoir ce qu'ils en pensent, mais on doit reconnaître qu'ils ont apporté là, comme autrefois Pélilot, des arguments favorables à la thèse suivant laquelle le sodium ne serait pas un élément nécessaire de la matière végétale et n'interviendrait pas dans les processus de sa formation.

N'ayant jamais abandonné la question biochimique des métaux alcalins et, en particulier, du sodium, tant à cause de son intérêt

au point de vue de la chimie comparée des espèces vivantes que de ses applications à la physiologie, à l'agriculture et à la médecine, j'ai continué de récolter, entre autres matériaux d'études, un grand nombre de plantes. Celles-ci ont été analysées à l'aide d'une méthode chimico-spectrographique très soigneusement étudiée pour reconnaître et, éventuellement, doser les métaux alcalins [9]. C'est ainsi qu'ont été obtenus les résultats que nous avons publiés, Didier Bertrand et moi, sur le rubidium [10] et sur le césium [11]. Les deux autres métaux alcalins ont également été dosés et je peux actuellement faire état des résultats obtenus sur près de 700 échantillons de plantes *phanérogames*. Élimination faite des analyses n'ayant porté que sur des parties de plantes ou sur des plantes halophiles, croissant dans la mer ou au bord de celle-ci, il reste les résultats obtenus sur plus de 540 échantillons représentant près de 450 espèces de dicotylédones et de monocotylédones, échantillons récoltés en bon état, au moment de la floraison et comportant la partie aérienne tout entière (3). Ces échantillons provenaient de différentes régions de la France, aussi de la Suisse, quelques-uns même de l'Angleterre et de l'Italie. *Le sodium a été retrouvé partout, dans toutes les espèces, sans aucune exception.*

Les quantités de métal alcalin ont été, en général, de plusieurs décigrammes par kilogramme de poids sec (dans environ 60 p. 100 des échantillons); assez souvent elles ont atteint plusieurs grammes (dans environ 17 p. 100) et parfois elles ont dépassé 10 g (environ 3,3 p. 100). Exceptionnellement, des plantes, bien que récoltées loin de la mer, ont présenté une richesse de plus de 20 g : *Limnanthemum peltatum*, 20,3 g ; *Pulicaria dysenterica*, 21,2 g ; *Lobelia dortmanna*, 28,4 g, par exemple (environ 0,6 p. 100). Inversement, une proportion de 18 p. 100 environ des plantes n'a présenté que des quantités de sodium de quelques centigrammes.

Si l'on remarque que la méthode d'investigation utilisée par les auteurs américains avait comme limite de sensibilité environ 0,1 g de sodium pour 1 kg de plante sèche, on comprend qu'ils n'aient pu reconnaître, dans certains cas, la présence du métal alcalin.

La notion de l'existence de plantes exemptes de sodium ne peut donc être tirée de leurs expériences, très intéressantes à d'autres égards; elle doit être remplacée par celle d'espèces végétales renfermant moins de 0,1 g de sodium par kilogramme de matière sèche.

Les résultats que j'apporte aujourd'hui complètent cette der-

(3) Sauf dans le cas des plantes ligneuses, en nombre d'ailleurs réduit, où il n'a été prélevé que des rameaux fleuris.



nière notion en déterminant pour de telles espèces les proportions de sodium que l'on peut encore y trouver.

Il ne me paraît pas excessif d'ajouter que les résultats ci-dessus rapportés font disparaître, d'une façon aussi définitive que cela est possible en biologie, une différence que l'on croyait exister; il n'y a pas encore bien longtemps, entre les animaux et les végétaux : les premiers renfermant toujours d'importantes quantités de Na et ne pouvant en être privés sans périr, les seconds n'en contenant que selon la composition du milieu dans lequel ils se développent et paraissant pouvoir s'en passer.

Je suis d'avis, au contraire, qu'il y a lieu de rapprocher plus que jamais la façon dont se comporte le sodium chez les plantes du rôle qu'il joue chez les animaux. Il est bien établi que le sodium présent en fortes proportions, surtout à l'état de chlorure, dans le sang et les humeurs de l'organisme animal, intervient comme le facteur principal de la pression osmotique. A côté de ce rôle physique, il joue, en petite quantité, à l'état de carbonate, un rôle chimique dans la digestion des substances protéiques par le pancréas. Un double rôle analogue serait rempli par le sodium chez les plantes : en proportions plus ou moins grandes, pouvant varier beaucoup suivant les milieux, il contribuerait au maintien de la pression osmotique du suc cellulaire et à la turgescence des tissus ; en très petites quantités, il agirait comme réactif dans certaines transformations chimiques, encore à préciser (4).

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] GRANDEAU. *Ann. Chim. Phys.*, 1863, **67**, 216.
- [2] DUHAMEL DE MONCEAU. *Mém. Acad. Sci.*, 1736, 215 et 1767, 233 et 239.
- [3] PÉLIGOT. *C. R. Acad. Sci.*, 1867, **65**, 729.
- [4] STRENG. *Zeitschr. analyt. Chem.*, 1884, **23**, 115.
- [5] G. BERTRAND. *Ann. Sci. agr.*, 1929, **46**, 1-8.
- [6] G. BERTRAND et J. PERIETZEAU. *Bull. Soc. chim. Fr.*, 1927, **41**, 709 et 1378.
- [7] G. BERTRAND et M. ROSENBLATT. *Bull. Soc. chim. Fr.*, 1928, **43**, 368 et 1133. — G. BERTRAND et V. GHITESCU. *C. R. Acad. Sci.*, 1934, **199**, 1269.
- [8] A. WALLACE, S. J. TOOTH et F. E. BEAR. *Soil Science*, 1948, **65**, n° 3.
- [9] G. BERTRAND et D. BERTRAND. *Mikrochemie vereinigt mit Mikrochimica Acta*, 1951, **36-37**, 2° partie, 1004-1014.
- [10] G. BERTRAND et D. BERTRAND. *C. R. Acad. Sci.*, 1944, **219**, 325 ; 1946, **222**, 423-572 ; 1948, **226**, 2104, etc.
- [11] G. BERTRAND et D. BERTRAND. *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **229**, 453.

(4) Un résumé du présent Mémoire a paru comme Note dans les *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1381. Les indications bibliographiques [4] et [10] de la Note doivent être remplacées par les indications [3] et [8] du Mémoire.

## COMSIDÉRATIONS SUR LA VALEUR DE LA VACCINATION ANTITUBERCULEUSE PAR LE BCG

par F. Van DEINSE.

(Chef du Service du BCG. Institut Pasteur, Paris.)

Le XIX<sup>e</sup> Congrès de l'Office International des Epizooties (O. I. E.), tenu à Paris du 21 au 26 mai 1951, sous la présidence du professeur Ramon, a constaté en matière de tuberculose bovine que les mesures sanitaires à elles seules sont capables d'en permettre l'éradication. Le Congrès recommande l'abatage hâtif des animaux qui réagissent positivement à la tuberculine. L'O. I. E. a confirmé à nouveau les 10 points de la résolution de la session de mai 1948 et notamment celui relatif à la mise en garde contre la pratique de la vaccination sur les bases actuellement connues comme moyen de prophylaxie de la tuberculose bovine. Toutefois, comme l'a recommandé M. Ramon, son directeur, dans son rapport technique du 21 mai 1951, l'O. I. E. « doit continuer à s'intéresser aux travaux entrepris en vue de découvrir un procédé de prévention spécifique de la tuberculose vraiment efficace ».

L'argumentation de M. Ramon faisant la substance de ce rapport technique se trouve dans son mémoire : « La lutte préventive contre la tuberculose », paru dans le *Bulletin* de l'O. I. E., mars-avril 1951, 35, n<sup>os</sup> 3-4, 113-176.

La lecture de ce mémoire nous a inspiré le présent article, que nous aurions été heureux de voir reproduire dans le *Bulletin* de l'O. I. E. M. Ramon, en nous renvoyant notre texte, a bien voulu nous expliquer que pour différentes raisons (entre autres parce que cet article aurait suscité de sa part une mise au point paragraphe par paragraphe, ce qui aurait tourné à la polémique), et, d'accord avec ses collègues les plus autorisés de l'O. I. E., il ne croyait pas qu'il y eût intérêt à publier notre article dans le *Bulletin* de l'O. I. E. C'est pour cette raison que nous avons soumis ce texte à la Rédaction des *Annales de l'Institut Pasteur* qui a bien voulu en assurer la publication. Le sujet, en effet, n'intéresse pas seulement les vétérinaires, mais également les médecins, et nous croyons utile de fournir à ceux-ci les éléments nécessaires pour qu'ils puissent se faire une opinion objective sur les arguments tirés du mémoire de G. Ramon.



L'exposé de G. Ramon, par son abondante documentation, par les citations dont il est truffé, par la vaste érudition dont il témoigne, doit forcément impressionner le lecteur. La tendance générale qui se dégage de l'article n'en aura que plus d'importance pour former le jugement des esprits non prévenus. C'est pourquoi il m'a paru indispensable, d'accord avec mes collègues de l'Institut Pasteur, de compléter l'exposé de G. Ramon qui a eu la malchance, au cours de ses recherches documentaires, de récolter surtout des textes ou des fragments de textes, qui, dans leur ensemble, peuvent faire naître une opinion par trop unilatérale sur la question.

Nous nous bornerons, en reprenant certains passages du texte de G. Ramon, à apporter un supplément d'information, que nous nous excusons de limiter à l'indispensable, en donnant les références bibliographiques qui les complètent. Pour ceux qu'intéresse la question, nous renvoyons au livre de K. Neville Irvine, *BCG Vaccination in Theory and Practice* [1].

Au sujet de la *vaccination avec des bacilles tués*, G. Ramon dit : « Ainsi les résultats obtenus chez le lapin et le cobaye avec le BCG ne semblent pas supérieurs à ceux acquis jadis par Calmette et Guérin chez la génisse à l'aide de bacilles tuberculeux tués. »

Qu'il me soit permis d'ajouter la remarque suivante : on sait qu'il est impossible de vacciner efficacement le cobaye et le lapin contre une infection tuberculeuse virulente. Tout ce qu'on obtient, chez ces animaux, c'est un retard de l'évolution de la tuberculose de surinfection. Il vaut donc mieux ne pas comparer les résultats obtenus chez les bovidés au moyen de bacilles tués à ceux qu'on obtient chez les cobayes et les lapins avec le BCG.

En ce qui concerne les *essais de vaccination de Maragliano au moyen de bacilles tués par chauffage* : Les essais de Maragliano ont eu si peu de succès que personne ne les poursuit en Italie. Petraghani et Salvioli ont essayé d'améliorer ce vaccin à bacilles morts en les soumettant à une trituration et à l'influence du formol. Au Congrès récent des phthisiologues italiens qui s'est tenu à Naples, du 4 au 7 avril dernier, et auquel je viens d'assister, Salvioli et Daddi ont défendu cette « anatuberculine intégrale de Petraghani », mais le BCG a eu, à ce même Congrès, une majorité substantielle de défenseurs (Monaldi, Blasio, Giovannardi, etc.), à la suite de la communication de Monaldi qui a montré que l'anatuberculine intégrale n'empêche pas l'apparition du complexe primaire, comme le fait le BCG [2].

Quant aux *bacilles tuberculeux tués enrobés dans la paraffine* ou dans l'huile de vaseline (Coulaud, Saenz), dont G. Ramon fait état pour montrer le rôle des substances adjuvantes, le mécanisme des phénomènes produits chez les animaux par les

bacilles tuberculeux mis en suspension dans la paraffine est loin d'être élucidé. Une chose est certaine, c'est que ces suspensions provoquent chez l'animal des lésions tellement importantes qu'il ne peut pas être question de s'en servir comme vaccin.

G. Ramon fait ensuite mention de vaccins composés de *bacilles tuberculeux tués par les rayons ultra-violets*. Des expériences intéressantes ont été, en effet, publiées par B. J. Olson et coll. [3], par R. W. Sarber et coll. [4], par Paterson et coll. [5] et, tout récemment, par A. Milzer et coll. [6], d'où il semble ressortir que, chez le *cobaye* et la *souris*, des bacilles virulents de type humain ou des bacilles de Wells (campagnol) soumis à l'action des rayons ultra-violets possèdent une valeur antigénique au moins égale à celle du BCG. Ce sont là, sans doute, des expériences dignes d'être continuées sur d'autres espèces animales, et, surtout, d'être confirmées dans d'autres pays.

G. Ramon me fait l'honneur de citer *mes travaux sur l'atténuation des B. K.* Des essais d'atténuation par repiquages successifs sur pomme de terre billée furent, en effet, entrepris par moi, en 1937, avec huit souches bovines et deux souches humaines, isolées par moi-même. Pour différentes raisons, ces passages ont été abandonnés pour les deux souches humaines et pour cinq des souches bovines, mais continués jusqu'à aujourd'hui avec trois souches bovines. Les observations, faites chez l'animal inoculé au cours de l'atténuation de ces souches, ont été l'objet de plusieurs publications [7]. Deux des souches bovines entretenues sur bile jusqu'à aujourd'hui ont montré une atténuation assez rapide et aucun retour à la virulence initiale de ces deux souches n'a pu être obtenu. La troisième, la souche « Gué », a été beaucoup plus difficile à atténuer et il a été possible, à deux reprises, au cent vingt-cinquième et au cent trente-quatrième passage sur bile, d'obtenir, par passages successifs sur des cobayes, un retour à la virulence initiale de cette souche. Des essais de ce genre font l'objet de nouvelles expériences en cours, avec les deux autres souches, jusqu'ici sans résultat. Mais même si ces nouvelles expériences restent sans résultat, il est bien évident qu'il s'agit de recherches de laboratoire et qu'il ne s'agit nullement d'introduire les souches atténuées ainsi obtenues, dans la pratique de la vaccination. Il n'est pas inutile d'insister ici sur le fait que des essais pour provoquer un retour à la virulence du BCG par passages successifs sur les animaux ont été entrepris par un grand nombre de chercheurs, sans succès, et que, depuis 1930 environ, personne ne parle plus de la possibilité d'un tel retour.

Nous voudrions dire quelques mots sur des *variations dans l'effet du BCG qui se seraient traduites, d'après G. Ramon, par des adénopathies plus fréquentes*. M<sup>me</sup> Kostic-Yoksic, de Belgrade [8], a fait des recherches spécialement dirigées sur les



adénopathies post-vaccinales, et elle a constaté que ces complications se présentent surtout chez les enfants vivant dans les montagnes de Croatie et non pas chez ceux vivant dans la plaine yougoslave, et elle conclut que ce sont surtout les enfants qu'on appelait autrefois « lymphatiques » qui sont sujets à cette complication. Nous savons aussi que certains confrères pratiquent les scarifications au BCG de façon trop intempestive, et augmentent ainsi le risque des adénopathies. Nous avons, au Service du BCG, l'impression que le pourcentage d'adénopathies qui nous sont signalées est sensiblement le même d'année en année, et qu'il n'y a pas lieu de croire à des variations quelconques de la virulence du BCG.

La *durée de conservation très courte* rendrait l'emploi du BCG aléatoire, dit G. Ramon. Cet argument ne joue pas pour la métropole où le service des transports est tellement perfectionné que tous les vaccins expédiés par le Service du BCG arrivent à destination le lendemain. Pour les pays d'outre-mer, nous disposons, depuis trois ans et demi, de vaccin BCG congelé desséché, de conservation beaucoup plus longue, et qui a donné en Afrique noire, en Malaisie, aux Philippines, etc., des résultats tout à fait satisfaisants. La technique de préparation de ce vaccin sec est assez délicate et, jusqu'à ce jour, seul l'Institut Pasteur a réussi à produire du vaccin BCG congelé-desséché ayant une valeur antigénique tout à fait superposable à celle du vaccin BCG frais. Les expérimentateurs américains [9], britanniques [10], norvégiens [11], australiens [12] qui se sont occupés de ce procédé de « lyophilisation » ont tous, jusqu'ici, obtenu des résultats très décevants, ce qui explique leur opinion pessimiste au sujet de l'efficacité du BCG lyophilisé.

G. Ramon insiste sur le fait qu'on ignore la relation entre la *réaction positive à la tuberculine et l'augmentation de résistance du sujet vacciné*. Bien entendu, les recherches de Birkhaug [13], entre autres, ont clairement montré que des animaux rendus sensibles à la tuberculine par une injection de BCG peuvent être désensibilisés par des injections répétées de tuberculine, sans que la résistance acquise vis-à-vis d'une injection virulente d'épreuve en soit diminuée. Arlindo de Assis [14] donne, aux nourrissons nés dans des familles tuberculeuses et vivant dans des conditions misérables, une dose de 100 mg de BCG par voie buccale à la naissance, et répète cette dose tous les mois jusqu'à l'âge de 6 mois : 600 mg au total. L'apport répété de BCG a un effet désensibilisant : les enfants ne réagissent pas à la tuberculine, mais ils résistent remarquablement aux contagions virulentes de leur entourage. Calmette [15] lui-même a d'ailleurs soutenu que allergie tuberculinique et résistance antituberculeuse étaient deux phénomènes distincts, comme le rappelle très justement G. Ramon.

Seulement, si, en principe, il doit donc être possible qu'une allergie existe sans immunité, nous possédons suffisamment d'évidence pour pouvoir admettre que, dans la pratique, cette même allergie est témoin, dans la grande majorité des cas, d'une résistance accrue vis-à-vis du bacille tuberculeux virulent. Je ne citerai comme exemple que les constatations bien connues de Heimbeck, à Oslo [16], qui vit, chez 625 infirmières positives à la tuberculine au moment de leur entrée à l'école d'infirmières, 0,9 p. 100 d'infections tuberculeuses et aucun décès par tuberculose, et parmi 280 négatives, 22,4 p. 100 d'infection et 3,6 p. 100 de mortalité tuberculeuse, observation bientôt confirmée par Törnell (de Stockholm) [17] : 0,2 p. 100 d'infections tuberculeuses parmi 451 infirmières positives à leur entrée, et 17 p. 100 chez 108 négatives. Ces chiffres furent encore confirmés par Rist [18], par Brun et Plauchu [19] en France, par Israël, Hetherington et Ord [20], par Brahdý [21] et par Zacks et Sartwell [22] aux Etats-Unis. Tout en reconnaissant notre ignorance sur le mécanisme intime de ce phénomène, nous ne pouvons qu'admettre le bien-fondé de cette notion sur laquelle est basée toute la vaccination par le BCG : le bacille tuberculeux de primo-infection est cause, en même temps, de l'apparition de la sensibilité tuberculinique cutanée, et d'une résistance accrue vis-à-vis des surinfections virulentes. Il est vrai également que le degré de cette résistance antituberculeuse est fonction du « terrain », et donc imprévisible d'un sujet à l'autre. Il n'y a aucun doute que certains sujets, tout en réagissant à la tuberculine, n'arrivent pas à élaborer une résistance suffisante contre les surinfections virulentes. Nous ne possédons pour le moment aucun moyen pour mesurer d'emblée le degré de cette résistance, et nous ne pouvons que la mesurer après coup, par la diminution de la morbidité et de la mortalité tuberculeuse chez des groupes de vaccinés, en comparaison avec des groupes de non vaccinés vivant dans les mêmes conditions et appartenant aux mêmes groupes d'âge. Tous les auteurs qui ont publié des statistiques valables à ce sujet arrivent à cette même constatation : la mortalité tuberculeuse chez les vaccinés est réduite au moins au 1/5 de ce qu'elle est chez les non vaccinés. Si donc la réaction positive à la tuberculine n'est pas une garantie absolue de l'état réfractaire à la tuberculose, elle nous permet néanmoins de prédire qu'un sujet négatif à la tuberculine et devenu sensible à la suite de la vaccination a au moins cinq fois moins de chances de mourir de tuberculose qu'un sujet également négatif non vacciné. Tous les spécialistes de la question sont d'accord pour dire que c'est surtout la primo-infection maladie que la vaccination au BCG permet d'éviter. Il est intéressant, sous ce rapport, de citer la voix autorisée de Knud Winge [23], du Dispensaire antituberculeux central de Copen-



hague, nous apprenant que dans cette ville, depuis 1936, aucun cas de méningite tuberculeuse ou de granulie n'a été vu par ce dispensaire parmi les enfants de familles tuberculeuses vaccinées au BCG et vivant en contact.

En traitant du nombre de germes vivants, donc actifs, présents dans « le vaccin BCG », G. Ramon rappelle que, *d'après Dubos, les vaccins BCG, couramment distribués aux Etats-Unis, ne contiendraient plus que moins de 1 p. 100 seulement de germes vivants au moment de l'inoculation.* Cette constatation extraordinaire est en contradiction flagrante avec les recherches périodiquement effectuées à l'Institut Pasteur et par d'autres auteurs (Birkhaug, entre autres [24]). Il n'est peut-être pas inutile d'insister sur le fait que la présence de Tween 80 dans le milieu de Dubos empêche le développement des germes BCG et que, pour cette raison, les résultats de Dubos, cités par G. Ramon, doivent être considérés comme entachés d'erreur.

G. Ramon cite les travaux récents de *Grasset et Bonifas (Bull. Acad. Suisse Sciences Méd., 1951, 7, n° 1, 71-86) qui ont constaté des altérations morphologiques et structurales, visibles au microscope électronique, causées par le broyage aux billes métalliques.* Dans le même article que cite G. Ramon, ces auteurs publient une photographie prise au microscope électronique d'une souche lyophilisée de BCG reçue de l'Institut Pasteur, où tous les éléments bacillaires sont intacts. Or, les germes composant cette souche lyophilisée de BCG ont été traités, par le même procédé mécanique, avant la congélation-dessiccation. Cela semble montrer que le broyage aux billes métalliques n'est pas, à lui seul, la cause de l'apparition, dans les suspensions vaccinales, de formes bacillaires dégradées (lysées). Aronson [25] avait d'ailleurs déjà insisté sur l'influence nocive d'un broyage trop prolongé, mais des expériences de contrôle non publiées, effectuées par nous-mêmes, nous ont montré qu'il n'en est rien.

Me faisant encore une fois l'honneur de citer certains de mes travaux, G. Ramon dit que *F. van Deinse et ses collaborateurs trouvent des différences de dimensions dans diverses préparations de BCG danoises et françaises.* C'est exact, mais il faut ajouter que les Danois ont utilisé un procédé d'entretien de la souche BCG différent de celui employé dans tous les autres laboratoires du monde, en pratiquant uniquement des passages successifs de la souche sur milieu de Sauton, milieu qui ne convient pas à l'entretien du BCG. Cette technique aberrante d'entretien de la souche BCG a donné lieu à des variations de vitalité, interprétées abusivement par les auteurs danois (Jensen, Holm [26]) comme des variations de virulence. Nous avons récemment eu l'occasion de contrôler, sous ce rapport, des vaccins et des cultures BCG qui nous sont parvenus de Norvège, de Suède, du Venezuela,

de Colombie, du Pérou, qui tous ont exactement la même morphologie que les germes composant le BCG français. Dans tous ces pays, la souche BCG est entretenue comme à l'Institut Pasteur, c'est-à-dire sur pomme de terre. Il s'ensuit qu'il suffit de ne pas enfreindre les règles d'entretien énoncées une fois pour toutes par Calmette et Guérin [27] pour éviter, à coup sûr, ces modifications morphologiques des germes BCG.

Dans une note, G. Ramon cite en passant quelques auteurs étrangers qui « ont donné, ces temps derniers, des résultats partiels portant sur quelques centaines ou quelques milliers de sujets vaccinés par le BCG ».

Je crois indispensable de compléter cette note, car les études auxquelles G. Ramon fait allusion sont justement parmi les plus importantes qui aient été faites sur la valeur de la vaccination BCG.

Il faut pour de telles études s'adresser à un nombre sensiblement égal de vaccinés et de témoins non vaccinés, vivant dans des conditions identiques et tous soumis à des examens cliniques rigoureux et répétés. Il va de soi que de telles études ne peuvent être entreprises que sur des nombres relativement restreints de sujets. Quand des expériences de ce genre sont faites avec toutes les garanties de rigueur scientifique et de compétence, et par des auteurs travaillant dans différents pays et parmi des populations de races différentes, on a le droit, si leurs conclusions sont favorables, d'en tenir compte et d'en déduire l'utilité de la vaccination par le BCG sur une vaste échelle. Qu'il me soit donc permis de citer, très brièvement, quelques-unes de ces études en renvoyant le lecteur, pour plus de détails, au livre de K. Neville Irvine [4], déjà cité plus haut.

Une étude qui a la valeur d'une expérience de laboratoire est celle publiée par Hyge [28]. Il s'agit d'une épidémie de primo-infection tuberculeuse, survenue dans une école danoise en 1943, due à un professeur tuberculeux. Il y avait, à cette école, 368 jeunes filles élèves, âgées de 12 à 19 ans, dont 133 avaient été vaccinées au BCG ; 105 élèves à réaction tuberculinique négative n'avaient pas encore été vaccinées. Parmi ces 105 élèves négatives non vaccinées, 94 ont été exposées à la contagion par le professeur et 70 d'entre elles ont fait leur virage à la tuberculine, 41 ont eu des lésions pulmonaires décelées soit par radiographie, soit par la mise en évidence de B. K. dans le produit de lavage gastrique. Les primo-infections étaient accompagnées huit fois d'érythème noueux, dix fois de pleurésie, une fois de péricardite, une fois de péritonite, et, dans 11 cas, la primo-infection donna lieu au développement d'une tuberculose pulmonaire évolutive, dont 7 avec cavernes, et 1 décès après généralisation. Parmi les 133 élèves vaccinées, 106 ont été exposées



à la même source de contagion. Il y eut parmi elles, par la suite, 2 cas de tuberculose pulmonaire avec cavernes et aucun cas de tuberculose primaire. Ces chiffres montrent avec évidence que la vaccination au BCG offre une protection solide contre la primo-infection tuberculeuse et est à même de prévenir, dans la majorité des cas, le développement d'une tuberculose évolutive.

Voici maintenant les résultats d'ensemble des vaccinations au BCG, pratiquées par Heimbeck [29], chez les élèves infirmières, de 1927 à 1948, tel que cet auteur les a publiés. Il y a eu, au total, 501 vaccinées au BCG, totalisant 4 958 années-observation, parmi lesquelles on compte 49 infections tuberculeuses (9,9 par 1 000 années-observation) et 5 décès par tuberculose (1 par 1 000 années-observation). Il y a eu 284 élèves infirmières à Pirquet négative non vaccinées, totalisant 2 563 années-observation. Parmi elles, il y eut 106 cas d'infections tuberculeuses (41,4 par 1 000 années-observation) et 12 décès par tuberculose (4,7 par 1 000 années-observation). L'immunité obtenue par le BCG réduit donc au quart la morbidité et la mortalité tuberculeuses chez des infirmières particulièrement exposées à la contagion. Ces chiffres se rapportent, pour chaque infirmière, aux trois ans de stage et à sa carrière ultérieure. En prenant séparément les observations faites durant les trois ans de stage, l'étude de Heimbeck montre que, durant cette période des contaminations massives, le BCG a réduit la morbidité et la mortalité tuberculeuses chez ces infirmières au 1/6.

Anderson et Belfrage [30] avaient vacciné au BCG, à la fin de 1945, 41 238 écoliers et jeunes adultes, à Gothenburg, en Suède. Il n'y avait eu, à ce moment-là, aucun décès par tuberculose parmi tous ces vaccinés, alors que parmi la population de Gothenburg la mortalité tuberculeuse était de 68 par 100 000.

Wallgren [31], à Gothenburg, a vacciné au BCG, de 1927 à 1937, 1 069 enfants de parents tuberculeux. En 1939, Anderson et Belfrage [30] firent une enquête et constatèrent que, parmi tous ces vaccinés de Wallgren, 15 étaient morts de maladies non tuberculeuses, 2 enfants seulement avaient été atteints de tuberculose bénigne complètement guérie. 97,1 p. 100 de ces enfants eurent une réaction positive à la tuberculine. Parmi les enfants, peu nombreux, dont les parents avaient refusé la vaccination, 5 étaient morts à l'hôpital de tuberculose.

Aux Etats-Unis, une étude extrêmement poussée et entourée de toutes les garanties souhaitables a été faite, par Aronson et Palmer [32], parmi les Indiens vivant dans des « Réserves ». Ces deux auteurs ont entrepris cette étude en 1936, ayant plutôt, au sujet du BCG, un préjugé défavorable, et ils entendaient au fond tirer de leur expérience des arguments décisifs contre l'efficacité

du BCG. Ils ont donc vacciné au BCG 1 551 jeunes Indiens, âgés de 1 à 19 ans, tous négatifs à la tuberculine, et 1 457 témoins de même âge appartenant aux mêmes tribus reçurent une injection intradermique d'eau physiologique. Des équipes mobiles ont traversé régulièrement les différentes « Réserves » et tous les sujets, vaccinés ou témoins, ont été et sont encore aujourd'hui soumis à des examens radiologiques et à des épreuves tuberculiniques deux fois par an.

Voici, très brièvement, les résultats publiés par Aronson [32] au Congrès international du BCG, en 1948. Parmi les 1 551 Indiens vaccinés, il n'y a eu que 6 décès par tuberculose (0,4 par 1 000 années-observation). Parmi les 1 457 témoins non vaccinés, il y a eu 53 décès par tuberculose (3,5 par 1 000 années-observation). Dans cette étude, le rapport entre vaccinés et non vaccinés en ce qui concerne la mortalité par tuberculose s'établit donc de 1 : 8,5.

Au Canada, Ferguson [33] commença, en 1938, la vaccination par le BCG des infirmières des hôpitaux et du personnel des sanatoriums du Saskatchewan, sans que les vaccinés fussent séparés du milieu de travail. Avant cette vaccination, il y eut, parmi le personnel de ces hôpitaux, 35 p. 100 d'infections tuberculeuses chez les infirmières négatives à leur entrée et 60 p. 100 chez les membres du personnel des sanatoriums au cours de la première année de contact. Les résultats publiés par Ferguson [33] montrent que la vaccination par le BCG a réduit au quart la fréquence des lésions tuberculeuses parmi les élèves infirmières anergiques des hôpitaux, au 1/5 celle des infections tuberculeuses manifestes parmi les infirmières anergiques des sanatoriums. Ferguson [33] a constaté, en outre, que les lésions tuberculeuses survenues chez les vaccinées sont moins étendues que chez les non vaccinées.

Dans un très important mémoire de G. Dahlström et H. Difs, paru dans *Acta Tuberculosea Scandinavica* (supplément 27, 1951), ces auteurs ont montré que, parmi 36 235 recrues de l'armée suédoise vaccinées au BCG à l'entrée au service, le taux des cas de tuberculose pulmonaire excavée post-primaire se rapporte à celui des cas de cette maladie parmi 25 239 recrues non vaccinées, comme 1 : 4,8.

Je ne veux pas insister davantage et je renvoie le lecteur que la question intéresse au livre de K. Neville Irvine [4] pour la liste complète de tous les détails de ce genre, montrant avec évidence la valeur préventive du vaccin BCG.

Que l'on est donc loin des résultats acquis à l'aide de certaines autres méthodes d'immunisation, par exemple, le vaccin contre la diphtérie, maladie épidémique, remarque G. Ramon. En effet, jamais on ne pourra s'attendre à obtenir par le BCG la dimi-



nution spectaculaire de la mortalité tuberculeuse, obtenue pour la mortalité diphtérique par l'anatoxine. Mais la tuberculose n'est pas comparable non plus à la diphtérie, ni le bacille tuberculeux au bacille diphtérique. Ce dernier produit une toxine aisément transformable en anatoxine, et l'immunisation est uniquement dirigée contre cette toxine, alors que le bacille tuberculeux ne produit pas de toxine dans le sens que nous sommes habitués à donner à ce terme. Car la tuberculine produite par le bacille tuberculeux n'est pas une toxine et ne produit des effets nocifs que dans l'organisme dûment sensibilisé vis-à-vis d'elle. La toxine diphtérique produit des anticorps qu'on peut mettre en évidence dans le sang circulant, la tuberculine ne possède pas cette propriété. Un sérum contenant des anticorps diphtériques neutralise les toxines diphtériques produites chez le malade et est doué, par ce fait, de propriétés curatives. Les anticorps tuberculeux qu'on peut mettre en évidence dans le sérum des tuberculeux par la réaction de déviation du complément ne jouent aucun rôle dans le mécanisme de l'immunité et n'exercent aucune influence curative dans la tuberculose. On ne peut donc pas comparer entre eux le procédé d'immunisation par l'anatoxine et celui de la prémunition antituberculeuse par le BCG, cette dernière soulevant des problèmes autrement difficiles à résoudre que l'immunisation contre la diphtérie et le tétanos.

Citant des recommandations de l'American Trudeau Society concernant le BCG, G. Ramon nous affirme que la *Société américaine Trudeau a déclaré que la vaccination par le BCG ne devrait être appliquée qu'à certains individus exposés presque à coup sûr à l'infection tuberculeuse*. Aux Etats-Unis, on est arrivé, par les méthodes classiques (dépistage, isolement, etc.), à réduire dans certaines villes et dans certains Etats la mortalité tuberculeuse à des chiffres extrêmement bas. Un certain nombre d'autorités médicales de ce pays estiment donc que la vaccination au BCG y est superflue. Cependant, le fait que la Société Trudeau [34] recommande la vaccination au BCG pour les individus particulièrement exposés à la contamination prouve qu'elle reconnaît l'utilité de cette méthode. Il ne faut pas passer sous silence la voix autorisée de Birkhaug [35] qui insiste sur le fait que le nombre d'individus encore négatifs à la tuberculine augmente de jour en jour et qu'augmente en même temps le nombre de ceux qui sont encore sans défense contre les primo-infections virulentes et que, par conséquent, la vaccination BCG sur une grande échelle s'impose. Il est exact que la Société Trudeau [34] recommande la continuation des études sur le problème de l'immunisation artificielle contre la tuberculose. Mais il faut y ajouter que, d'après cette même société, ces études doivent porter sur :

a) Une amélioration du vaccin BCG ;

b) Une amélioration des critères de vaccination et de revaccination par le BCG ;

c) Un choix plus exact des groupes de la population générale ayant besoin de cette vaccination ;

d) L'encouragement de programmes d'études de ce genre ;

e) Le maniement adéquat de statistiques concernant les résultats obtenus chez un nombre important d'individus vaccinés au BCG.

La Société Trudeau [34] constate enfin que les études publiées dans la littérature permettent de s'attendre, à la suite de la vaccination par le BCG, à une réduction appréciable de la fréquence des cas de tuberculose clinique parmi certains groupes de personnes particulièrement exposées à la contagion. Elle recommande donc cette vaccination aux médecins, aux étudiants en médecine, aux infirmières soignant des tuberculeux, au personnel des hôpitaux et de laboratoire s'occupant de bacilles tuberculeux, aux sujets vivant en contact avec des tuberculeux au foyer, aux internés et aux employés des asiles d'aliénés et, enfin, aux enfants et à certains adultes considérés comme moins résistants et vivant dans des communautés où le taux de la mortalité par tuberculose est très élevé. La Société Trudeau [34] recommande de continuer les efforts pour perfectionner la préparation du vaccin BCG, de le standardiser si possible, et de donner éventuellement licence à des firmes commerciales de produire le vaccin BCG conformément aux règlements de la Santé publique en vigueur.

Même les auteurs les plus convaincus de l'utilité du BCG sont d'accord pour reconnaître que le BCG n'est pas une panacée et réussit seulement à réduire la mortalité par tuberculose au 1/5. En énonçant une fois de plus cette donnée expérimentale, la Société Trudeau [34] ne fait qu'entériner une vérité connue de tous. C'est pourquoi elle recommande, exactement comme le font tous ceux qui utilisent le BCG, de maintenir à côté de la vaccination au BCG toutes les mesures habituelles de prophylaxie anti-tuberculeuse.

G. Ramon nous apprend que le *Conseil américain de Chimie et de Pharmacie met en relief la sécurité et la grande efficacité des agents bien connus d'immunisation dirigés contre diverses autres maladies infectieuses et les oppose à l'efficacité toute relative, incertaine, du BCG*. G. Ramon suppose que le Conseil fait allusion aux anatoxines. Nous l'avons déjà dit, aucune comparaison n'est possible entre la tuberculose, d'une part, et des maladies infectieuses comme la diphtérie ou le tétanos, d'autre part. Notamment, la neutralisation des toxines par des sérums ou la production artificielle d'anticorps par des anatoxines n'entre pas en jeu dans la tuberculose.

Dans l'éditorial de R. J. Anderson [36] que cite G. Ramon, le



chef de la division de la Tuberculose du Service de Santé publique des Etats-Unis annonce que, le 12 juillet 1950, son service a autorisé la Fondation de Recherches de l'Université de l'Illinois à « produire, exporter, importer et vendre le vaccin BCG ». Anderson [36] est d'avis, comme la Société Trudeau et le Collège américain des Chest Physicians, qu'il faut se livrer tout d'abord à de nouvelles expériences sur l'efficacité du BCG et recommande son emploi chez des groupes de personnes particulièrement exposées à la contagion. Bien entendu, Anderson [36] est d'avis qu'il sera utile de continuer des recherches visant à obtenir un vaccin encore plus efficace que le BCG ; sur ce point tout le monde est d'accord. Anderson [36], dont l'opinion à ce sujet est partagée par J. A. Myers [37] et S. A. Slater [38], considère comme un désavantage que la vaccination BCG sur une grande échelle va créer artificiellement une allergie à la tuberculine chez un grand nombre de personnes et privera ainsi la lutte antituberculeuse d'un puissant moyen de dépistage. Il recommande que les services de santé des différents Etats élaborent, chacun dans sa juridiction, des campagnes de vaccination au BCG dûment contrôlées, pour qu'aux Etats-Unis on puisse acquérir des informations exactes sur l'efficacité du vaccin. Un début de travail dans ce sens a déjà été fait dans le Wisconsin et l'Etat de New-York. Anderson et Palmer [39] nous apprennent d'abord que du vaccin BCG sec « lyophilisé », préparé aux Etats-Unis, a provoqué un taux d'allergie de beaucoup inférieur à celui obtenu avec des vaccins BCG frais. Il n'y a là rien d'étonnant car nous savons que les méthodes de congélation-dessiccation, employées aux Etats-Unis à titre expérimental, ont abouti à une mortalité considérable de germes contenus dans ces vaccins. Il n'est pas inutile d'insister, encore une fois, sur le fait que *seuls jusqu'ici la méthode et l'appareillage utilisés à l'Institut Pasteur de Paris ont permis d'obtenir un vaccin BCG sec*, dans lequel les germes n'ont subi aucune mortalité durant les opérations et qui a déjà donné, dans différentes parties du monde [40] et en France, des taux d'allergie absolument comparables à ceux qu'on obtient avec le BCG frais. Anderson et Palmer [39] annoncent ensuite, qu'à titre expérimental, on a commencé, en 1947, une grande campagne de vaccination au BCG parmi 11 000 écoliers de la ville de Columbus, dans l'Etat de Georgia, qu'au printemps de 1950 le programme fut étendu à toute la population adulte de cette ville, et qu'ainsi cette étude comprend 75 000 personnes vaccinées. Toujours d'après les mêmes auteurs, un second programme fut mis sur pied en 1949, comprenant la vaccination de plus de 30 000 enfants indiens. Et, enfin, un troisième programme, le plus important de tous, fut commencé en automne 1949, à Porto-Rico, où tous les écoliers non allergiques furent vaccinés au BCG ;

au cours de l'été 1950, les enfants d'âge pré-scolaire ont également été vaccinés à Porto-Rico. On comprendra que les autorités américaines, avant de se lancer dans une campagne de vaccination antituberculeuse de grande envergure, aient senti le besoin d'entreprendre ces vastes expériences, entourées de tout le contrôle nécessaire, pour tâcher de se faire une idée exacte de l'utilité du procédé. Nous connaissons, en effet, la tendance des Américains à reprendre et à « repenser » tous les problèmes scientifiques considérés comme résolus dans le Vieux Monde.

J'aborde maintenant le sujet de la *prémunition du bétail* avec une certaine hésitation, ne connaissant pas, comme G. Ramon, toutes les contingences pratiques de cette vaccination chez les bovidés. Je voudrais, cependant, dire quelques mots sur l'atténuation du BCG depuis la première expérience de Calmette et Guérin [41].

Il est hors de doute que la souche Nocard, qui allait devenir par la suite le BCG, quand elle n'avait subi que 33 ou 34 repiquages sur pomme de terre biliée, n'avait pas encore atteint le degré d'atténuation qu'elle possédait après 230 passages, au moment où on a commencé à s'en servir pour la vaccination des humains. Cela a été un des phénomènes les plus curieux, observé au cours de son atténuation progressive, que la souche Nocard, souche bovine très virulente, fût déjà devenue incapable de tuberculiser les bovidés après un nombre si restreint de passages sur bile. Il est très probable que des essais de passages de cobaye à cobaye effectués à ce moment-là auraient encore abouti à un retour à la virulence initiale, comme ce fut le cas pour notre souche « Gué », après le cent trente-quatrième passage. En tout cas, le degré de virulence de la souche Nocard était certainement de beaucoup supérieur, à ce moment-là, à celui que possède aujourd'hui le BCG, et son pouvoir immunisateur devait être, lui aussi, bien plus prononcé que celui du BCG actuel. De là à conclure que le BCG actuel est devenu trop atténué pour posséder encore une efficacité immunisatrice suffisante, nous estimons qu'une telle conclusion est contraire aux faits dûment constatés.

La courbe exprimant l'atténuation du BCG a plus ou moins la forme d'une asymptote, c'est-à-dire qu'après une chute rapide l'atténuation, tout en continuant, tend à se ralentir et que l'on arrive finalement à un état d'atténuation stable : le BCG et les souches bovines biliées, que nous avons pu étudier nous-mêmes, qui, tout en possédant toujours un reste de virulence, leur permettant de créer dans l'organisme inoculé des lésions histologiquement tuberculeuses, dans lesquelles les bacilles-vaccins se multiplient, ne sont plus capables de provoquer des lésions tuberculeuses évolutives, c'est-à-dire de conférer à l'organisme inoculé



la tuberculose-maladie. Cette stabilisation du degré d'atténuation, atteint après un grand nombre de passages sur bile, nombre apparemment différent d'une souche à l'autre, n'a pas lieu seulement quand les souches en question, après un nombre donné de passages sur bile, sont remises sur des milieux de culture normaux, mais s'observe aussi quand on maintient indéfiniment la souche sur bile. Nous avons de ce phénomène deux exemples bien connus : la souche BCG utilisée en Suède, où elle est maintenue encore aujourd'hui, sans discontinuer, sur pomme de terre biliée [42], et la souche BCG entretenue à Montevideo, où on la réensemence également sur pomme de terre biliée sans interruption [43]. Ces deux souches ont été envoyées à l'Institut Pasteur et ont été éprouvées sur le cobaye comparativement avec le BCG français et on a pu ainsi constater qu'elles ne se distinguent en rien de ce dernier, pourtant entretenu depuis de longues années sur pomme de terre glycinée non biliée.

Nous devons, enfin, nous référer aux rapports qui ont été lus au I<sup>er</sup> Congrès international du BCG, à Paris, en 1948. Comme ces rapports émettent une toute autre opinion sur l'efficacité du BCG chez les bovidés, il nous paraît indispensable d'en reproduire les résumés :

I. — Professeur A. Ascoli (Italie) [44] : *Rôle des bovins dans la prophylaxie spécifique de la tuberculose par le BCG.*

« L'auteur rappelle ses expériences, commencées en 1930, quand 5 veaux vaccinés à la naissance par la voie sous-cutanée avec du BCG vivant, et revaccinés tous les six mois, 5 autres veaux injectés par la même voie avec du BCG tué, 4 veaux inoculés avec des bacilles tuberculeux bovins virulents tués et 3 autres veaux non vaccinés témoins furent nourris pendant cinquante jours par des vaches normales, et ensuite par des vaches tuberculeuses. Après dix mois de cohabitation avec ces animaux tuberculeux, les vaches tuberculeuses furent transférées à d'autres étables, et cinquante jours après leur départ, les veaux furent tués. Parmi les 5 veaux vaccinés avec du BCG vivant, 4 furent trouvés indemnes de tuberculose, le cinquième avait des nodules suspects sur une glande mésentérique. Tous les autres veaux de cette expérience étaient tuberculeux. Dans la deuxième expérience, 4 veaux vaccinés au BCG vivant et revaccinés trois à quatre mois plus tard, 4 veaux vaccinés avec des bacilles tuberculeux humains vivants, 8 veaux vaccinés avec des bacilles humains tués et 4 témoins non vaccinés furent nourris dans une grande étable par des vaches vaccinées et revaccinées au BCG, pendant six mois ; les vaches normales furent alors remplacées

par 5 vaches tuberculeuses et 5 nouveaux veaux furent ajoutés à l'effectif, ces derniers ayant été préalablement inoculés par voie intraveineuse avec des bacilles bovins virulents. Après six mois de cohabitation contagieuse, les veaux vaccinés et témoins furent sacrifiés. Les 4 veaux vaccinés avec du BCG vivant étaient indemnes de toute lésion tuberculeuse ; 1 des témoins était également indemne, mais les 3 autres étaient porteurs de lésions tuberculeuses ; 3 des veaux vaccinés avec des bacilles humains vivants étaient normaux, le quatrième avait deux nodules tuberculeux et 2 des veaux vaccinés avec des bacilles humains tués étaient normaux, tous les autres étaient tuberculeux. L'efficacité du BCG est démontrée de la façon la plus évidente chez les bovins par l'épreuve de la cohabitation. »

II. — J. Dessouter (France) [45] : *La vaccination des bovidés par le BCG.*

« En France, à peu près 40 p. 100 des bovins sont tuberculeux. Cela représente une perte financière extraordinaire.

« Il y a vingt-cinq ans, le père de l'auteur décida d'éliminer tous les bovins, réagissant à la tuberculine, de son élevage, c'est-à-dire 30 p. 100 de l'effectif, et de les remplacer par des animaux négatifs à la tuberculine. Un an plus tard, il y eut de nouveau 30 p. 100 d'animaux positifs dans son élevage. Après deux essais infructueux de ce genre, il mit son troupeau à la disposition de l'Institut Pasteur (1926) à deux conditions :

« 1° Que tous les veaux vaccinés au BCG, au cours des dix premiers jours de leur vie, resteraient en contact avec le troupeau (ceci pour mettre la vaccination au BCG à une sérieuse épreuve) ;

« 2° Qu'il serait libre d'éliminer les vaches non productives pour des raisons d'économie. Cette expérience a maintenant été poursuivie depuis vingt-deux ans avec d'excellents résultats : 2 500 animaux ont été vaccinés depuis 1926 et, parmi eux, 4 seulement ont été déclarés totalement impropres à la consommation à l'abatage ; c'était au début de l'expérience, quand il se trouvait encore dans le troupeau de nombreux animaux allergiques, et, pendant toute cette période de vingt-deux ans, 4 animaux vaccinés furent déclarés partiellement impropres à la consommation. Naturellement, on se trouve devant l'inconvénient de l'existence de réactions positives à la tuberculine, artificielles, dues au BCG, mais une fois le procédé connu et universellement adopté, il doit être facile d'adapter les règlements légaux à cette nouvelle condition, pour que des réactions positives causées par le BCG ne soient pas un obstacle à la vente des bovins vaccinés. »



III. — F. Gerlach (Autriche) [46] : *Critique de l'innocuité et de l'utilité de la vaccination du bétail par le BCG basée sur une expérience de quatorze années.*

« L'auteur a montré, par des milliers d'inoculations à des animaux de laboratoire, que les prétentions de Petroff et d'autres concernant un retour possible à la virulence du BCG sont sans fondement. Son expérience de vaccination des bovins par le BCG l'a convaincu de l'efficacité de cette méthode. Il rappelle sa recommandation d'établir une marque reconnue de façon internationale, indiquant les cas d'allergie dus au BCG parmi les bovins vaccinés.

« Après les premiers résultats satisfaisants obtenus, à l'Institut de Mödling, chez des singes, des lapins et des cobayes, ainsi que chez des veaux et des bovins, plus de 10 000 veaux et bovins ont subi la vaccination au BCG en Autriche. Les conditions d'élevage dans ce pays étant incompatibles avec l'isolement des veaux vaccinés, les bons résultats obtenus n'en sont que plus remarquables, en particulier dans un pays où souvent plus de 50 p. 100 des bovins sont atteints de tuberculose. De nombreux rapports provenant de vétérinaires locaux insistent sur la possibilité d'élever des veaux bien portants dans des troupeaux infestés de tuberculose grâce au BCG. L'auteur cite plusieurs de ces rapports. En voici un exemple : dans une ferme d'élevage, en Autriche, il existait, en 1926 et 1927, 8,5 p. 100 de mortalité par tuberculose dans un troupeau comprenant 140 vaches et 90 génisses. Aujourd'hui, dans cette même ferme, la mortalité par tuberculose n'est plus que de 0,5 p. 100 dans un troupeau comprenant 120 vaches et 150 génisses. Ce résultat est dû exclusivement à la vaccination au BCG et aux revaccinations. Tous les rapports insistent sur l'innocuité absolue de la méthode. Les autorités publiques sont également favorables au BCG et, dans un rapport émanant d'une autorité vétérinaire, il est constaté que la vaccination au BCG permettra d'éliminer complètement la tuberculose bovine de son département, où la tuberculose bovine était autrefois tellement répandue qu'on avait proposé l'abatage de tous les bovins avec indemnités allouées par l'Etat aux propriétaires. Le résultat de tant d'opinions favorables dans la pratique vétérinaire fut un décret du Ministère fédéral d'Agriculture et d'Economie forestière datant du 30 avril 1935, recommandant l'emploi généralisé de la vaccination au BCG dans tous les troupeaux infestés de tuberculose en Autriche, et insistant sur l'innocuité absolue du procédé. »

IV. — G. Girard (France) [47] : *Prémunition antituberculeuse des bovidés par le BCG à Madagascar.*

« De 1928 à 1941, 4 024 bovidés ont été vaccinés au BCG à

Madagascar où la tuberculose bovine est très répandue. Il est impossible, à Madagascar, d'isoler les veaux vaccinés, mais comme ils ne vivent pas dans des étables, le danger de contagion y est moins sérieux qu'en France, et les résultats de cette vaccination sont tout à fait satisfaisants. »

V. — Même auteur : *Prémunition antituberculeuse des porcins par le BCG à Madagascar.*

« A Madagascar, la tuberculose porcine est très fréquente. De 1930 à 1942, plus de 1 800 porcs ont été vaccinés au BCG à la naissance (une dose de 1 mg de BCG par voie sous-cutanée) avec d'excellents résultats. »

VI. — P. Hautcœur (France) [48] : *Application systématique de la vaccination par le BCG sur les bovidés d'une ferme d'élevage pendant vingt-quatre ans.*

« Description détaillée d'une expérience de vaccination au BCG des bovins d'une ferme d'élevage en France, commencée en octobre 1924, quand 29 sur 32 vaches réagirent positivement à la tuberculine. D'octobre 1924 à janvier 1948, 1 098 veaux ont été vaccinés et les animaux non vendus furent revaccinés chaque année. Au début de cette campagne, de nombreuses vaches provenant de cet élevage furent trouvées tuberculeuses à l'abatage. Parmi les 1 098 animaux vaccinés, 2 seulement furent trouvés tuberculeux au début de l'expérience, quand il y avait encore beaucoup de vaches tuberculeuses dans le troupeau. Depuis 1926, pas un seul cas de tuberculose n'a été constaté parmi les bovins de cette ferme, comprenant aujourd'hui 4 taureaux, 77 vaches, 40 génisses âgées de 1 à 3 ans, 36 veaux âgés de 1 à 9 mois, 22 jeunes taureaux âgés de 0 à 9 mois. Beaucoup de ces animaux ont gagné des prix : tous sont dans une condition excellente. La tuberculose a complètement disparu de cet élevage. »

VII. — A. Richart (France) [49] : *Dix-huit années d'application de vaccination antituberculeuse des bovidés par le BCG dans la pratique rurale (1921-1939).*

« Deux expériences de vaccinations au BCG furent commencées en 1921, l'une dans une ferme d'élevage infestée de tuberculose près de Rouen (Saint-Yon), où toutes les vaches tuberculeuses de deux autres fermes avaient été assemblées, et une seconde dans un grand élevage au domaine de Gruville. Le principe était de ne prendre aucune mesure d'hygiène, excepté la vaccination des veaux nouveau-nés et leur revaccination.

Voici les résultats obtenus à la ferme de Gruville (1921-1939) : sur 171 bovins, vaccinés et régulièrement revaccinés au BCG, 6 furent trouvés tuberculeux à l'abatage. Parmi 210 animaux non vaccinés (ancien effectif avant la vaccination), 17 eurent des lésions tuberculeuses à l'abatage.

« L'innocuité de la méthode ressort du développement normal, de la fécondité et de la production de lait remarquables des vaches vaccinées. Pendant toute la durée de la campagne, des bovins tuberculeux étaient constamment présents dans le troupeau. La vaccination au BCG fut arrêtée à la déclaration de la guerre en 1939.

« A la ferme départementale de Saint-Yon, il y eut 12 vaches réagissant à la tuberculine en 1921. La dernière de ces vaches fut abattue en 1926. 11 parmi les 12 furent trouvées tuberculeuses à l'autopsie. De 1921 à 1931, 33 vaches, vaccinées à la naissance et régulièrement revaccinées, furent ajoutées à ces effectifs infectés. Trois d'entre elles sont mortes de maladies non tuberculeuses, 30 furent abattues (la dernière en 1940) et trouvées indemnes de tuberculose à l'autopsie. »

Il n'est pas inutile non plus de reproduire ici des opinions, émises au cours de la discussion qui a suivi les deux rapports de G. Girard [47]. Voici d'abord celle de M. Clément Bressou [50], directeur de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort :

« Je m'associe très volontiers à la demande d'expérience qui vient d'être faite. Non seulement en mon nom personnel, mais je puis le dire, au nom des éleveurs français dont je vois ici un éminent représentant ; tout l'élevage français demande qu'on lui permette de faire l'expérience du BCG ; ce ne sont que les lois sanitaires et l'administration sanitaire qui s'opposent à l'expérience du BCG. Je crois qu'on pourrait trouver des aménagements à une loi qui a fait faillite en France, je ne dis pas à l'étranger. Depuis quinze ans, cette loi, faite avant que le BCG n'ait pu apporter ses preuves, a été maintenue. L'Association des Eleveurs et son Secrétaire ici présent demandent qu'on leur permette de faire l'expérience du BCG. »

Ensuite ce fut le tour de E. Graeub [51], de l'Institut de Bactériologie et de Sérologie de Berne, de prendre la parole.

Cet auteur relate « les expériences de vaccination chez les bœufs non au moyen du BCG, mais avec une autre souche d'origine bovine comparable au BCG. Graeub [51] recommande de pratiquer les injections de vaccin à des endroits différents au moment des revaccinations, pour que ce ne soit pas toujours les mêmes ganglions lymphatiques satellites qui soient touchés par les altérations tuberculeuses dues au vaccin ».

Il est intéressant de noter que E. Graeub [51], tout en utilisant



une autre souche que le BCG, se montre néanmoins partisan des bacilles-vaccins, c'est-à-dire du même principe sur lequel est fondé le vaccin BCG.

Quant à l'opinion du vétérinaire polonais M. Kaplan, opinion citée par G. Ramon, Kaplan dit, en effet, que des vaccinations répétées de veaux au BCG confèrent à ces animaux un degré élevé de protection contre l'infection tuberculeuse jusqu'à la seconde année de leur vie, et que par la suite l'immunité diminue malgré les inoculations répétées du vaccin. Nous voulons simplement faire remarquer à ce sujet que cette opinion de Kaplan, d'après laquelle la vaccination perd son efficacité après la seconde année, est contraire à celle de tous ceux qui possèdent une longue expérience de la vaccination des bovidés par le BCG (Ascoli, Dessouter, Gerlach, Girard, Hautcœur, Richart, etc., voir plus haut).

G. Ramon nous apprend qu'au Danemark tout emploi du BCG contre la tuberculose des bovidés est interdit. Or, nous avons pris la peine de nous renseigner à ce sujet auprès de nos collègues de l'Institut du Sérum de Copenhague. Ils nous ont appris qu'une loi interdisant le BCG chez les bovidés n'existe pas au Danemark. Dans ce pays, Bang a institué, dès 1892, sa méthode de lutte contre la tuberculose bovine, dont l'efficacité n'est devenue sensible qu'aux environs de 1920. Mais c'est seulement depuis le décret du 26 juin 1932 que les résultats de ce « nettoyage » du cheptel se sont fait vraiment sentir, surtout quand le « Décret de destruction » du 28 novembre 1934 est venu garantir une subvention importante du Gouvernement danois pour la destruction de tous les animaux positifs à la tuberculine. Durant les deux années qui suivirent pas moins de 110 000 têtes de bétail furent abattues, conformément à la loi et beaucoup de régions ont été ainsi complètement débarrassées de la tuberculose bovine [52]. Il est évident que cette méthode de Bang, fondée sur l'abatage des animaux positifs à la tuberculine, est incompatible avec la vaccination BCG pour des raisons faciles à comprendre. C'est donc uniquement pour des raisons pratiques et non pas à cause d'un doute quelconque sur l'efficacité du BCG qu'on ne vaccine pas les bovidés au BCG au Danemark.

Qu'il nous soit permis, au sujet de la loi du 7 juillet 1933 sur la prophylaxie de la tuberculose des bovidés, dont G. Ramon fait mention dans une citation tirée d'un discours de C. Guérin, de citer quelques passages de la circulaire n° 252 du Ministère de l'Agriculture du 20 février 1931, dont le texte concernant la prophylaxie de la tuberculose bovine a été établi par M. Merle, Directeur des Services vétérinaires du Ministère de l'Agriculture, en collaboration avec M. Guérin :

« Les étables infectées seront assainies, selon le procédé indiqué pour l'application de la loi du 7 juillet 1933 ou soumises à la vaccination par le BCG, quand l'élimination des tuberculeux par l'abatage risquera de compromettre la marche normale de l'exploitation et s'avérera trop onéreuse. »

... « Lorsque dans une zone déterminée, la proportion d'exploitations atteintes est élevée et que dans chacune d'elles le pourcentage d'animaux réagissants est important, la vaccination est le seul moyen économique d'assainir le cheptel. Il n'est pas possible de définir une règle pour l'ensemble du pays ; il appartiendra aux Directeurs des Services vétérinaires, en accord avec les organisations locales intéressées, de proposer leur programme d'action. »

« La vaccination, pratiquée dans les conditions prévues par l'arrêté du 17 août 1936, sera, en outre, pratiquée sur les veaux nés de mères non réagissantes dans des étables indemnes. Ils seront destinés à être vendus au sevrage pour la reconstitution des troupeaux atteints. »

« Les animaux seront marqués (tatouage ou bouton d'oreille) et livrés aux acheteurs, accompagnés d'un certificat de vaccination conforme aux indications du registre d'étable (circulaire du 17 août 1936) ; ils seront revaccinés chaque année ; les certificats, sur lesquels seront enregistrées les constatations faites à l'autopsie, vous seront retournés après l'abatage. »

La technique de vaccination des bovidés, telle qu'elle est employée aujourd'hui, consiste à inoculer, chez le veau nouveau-né, 50 mg de BCG en suspension dans 10 cm<sup>3</sup> de liquide par voie sous-cutanée et à répéter cette injection tous les ans, sans s'occuper des réactions à la tuberculine que pourraient présenter ces animaux (on sait que chez l'homme on revaccine seulement quand l'allergie post-vaccinale s'est éteinte ; cette pratique est à rejeter chez les bovidés).

G. Ramon cite les *expériences de Dalling* comme exemple de l'inefficacité du BCG chez les bovins. Ces expériences ne peuvent pas être considérées comme comparables à ce qui se pratique en France, car Dalling injecte la même dose de BCG par voie intraveineuse. Si cette voie d'inoculation a pu donner d'excellents résultats à Calmette et Guérin avec le trentième passage de leur souche sur bile, très insuffisamment atténuée, il n'en reste pas moins que la voie intraveineuse est une mauvaise voie d'introduction du vaccin et que l'inoculation sous-cutanée du vaccin (cutanée chez l'homme) lui est de beaucoup préférable. C'est pourquoi, encore une fois, les expériences de Dalling ne peuvent pas être mises en avant pour juger de l'efficacité de la vaccination chez les bovidés.

La vaccination des bovidés par le bacille de Wells par la voie

intraveineuse [53] peut être, elle, comparée à la vaccination des bovidés par Calmette et Guérin avec leur trente-troisième passage, car nous savons que le bacille de Wells est beaucoup plus virulent que le BCG, à tel point, que l'injection de 1/100 mg de ce bacille par voie intradermique provoque chez l'homme des ulcérations tellement importantes, qu'on a dû abandonner cette technique d'inoculation avec le bacille de Wells, et qu'on n'utilise plus pour ce vaccin, chez l'homme, que la méthode des ponctions multiples [54].

Ne voulant pas abuser de la patience du lecteur nous arrêterons ici les considérations que nous a inspirées l'article de G. Ramon, qui appellerait bien d'autres développements encore. Qu'il soit bien entendu que nous ne prétendons pas du tout ici critiquer l'érudition de G. Ramon et qu'il s'agit uniquement, de notre part, d'un effort pour apaiser les inquiétudes que l'exposé de G. Ramon a fait naître dans beaucoup d'esprits, résultat sans doute involontaire de la part de G. Ramon lui-même, dont nous connaissons l'attachement aux réalisations pasteurienues.

Pour notre part, nous n'avons certainement pas le droit d'abandonner nos enfants aux hasards des contaminations tuberculeuses fortuites sous prétexte que le BCG ne donne que 80 à 90 p. 100 de protection, tant que nous ne disposerons pas d'un autre vaccin antituberculeux donnant des résultats encore meilleurs et *ayant fait ses preuves*.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BLACKWELL, éd. Oxford, 1949, traduction française chez MASSON, Paris, 1950. *Théorie et Pratique de la Vaccination par le BCG*.
- [2] Voir aussi l'article de M. RAMAGLIA et F. SENIS, *Archivio di Tisiologia*, 1951, 6, 170-180, où on lit que chez les enfants vaccinés à la naissance avec l'anatuberculine de Petragiani, la primo-infection virulente se déroule comme chez les non vaccinés.
- [3] B. J. OLSON et coll. *Publ. Health Rep.*, 1947, 62, 293.
- [4] R. W. SARBER et coll. *Am. Rev. Tub.*, 1950, 62, 418.
- [5] PATERSON et coll. *Can. J. Res.*, 1949, 27, 37.
- [6] A. MILZER et coll. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, 75, 433.
- [7] F. VAN DEINSE. *Ces Annales*, 1941, 66, 191. — J. BABLET et F. VAN DEINSE. *Ces Annales*, 1943, 69, 45. — F. VAN DEINSE. *Ces Annales*, 1946, 72, 241, 424 et 567.
- [8] Communication personnelle.
- [9] S. R. ROSENTHAL. *I<sup>er</sup> Congrès Intern. BCG*, Paris, 1948, 40. — K. BIRKHAUG. *Am. J. Publ. Health*, 1950, 40, 545.
- [10] J. UNGAR et P. MUGGLETON. *I<sup>er</sup> Congrès Intern. BCG*, Paris, 1948, 49. — J. UNGAR. *Tubercle*, 1949, 30, 2.
- [11] J. BOË. *Acta Tuberc. Scand.*, 1950, 24, 98.
- [12] E. A. NORTH. *Med. J. Austr.*, 1950, 5, 171.
- [13] K. BIRKHAUG. *Acta Tuberc. Scand.*, 1939, 43, n<sup>os</sup> 1-2, 163-192.
- [14] J. ROSEMBERG. *O Hospital*, 1950, 38, 73-104.



- [15] A. CALMETTE. *VIII<sup>e</sup> Conférence de l'Union Intern. contre la Tuberculose*, La Haye-Amsterdam, 1932, 97.
- [16] J. HEIMBECK. *Tubercle*, 1936, **18**, 97.
- [17] K. BIRKHAUG. *Am. Rev. Tub.*, 1947, **55**, 234-249.
- [18] E. RIST. *Bull. Acad. Méd.*, 1938, **119**, 52.
- [19] BRUN et PLAUCHU. *Rev. Tub.*, 1947, **11**, 356-361.
- [20] H. L. ISRAËL, H. W. HETHERINGTON et J. G. ORD. *J. A. M. A.*, 1941, **117**, 839.
- [21] L. BRAHDY. *Am. J. Publ. Health*, 1941, **31**, 1040.
- [22] D. ZACKS et P. E. SARTWELL. *Am. J. Publ. Health*, 1942, **32**, 732.
- [23] KNUD WINGE. *Acta Tuberc. Scand.*, 1949, **23**, 233-249.
- [24] K. BIRKHAUG. *Soc. Franç. de Microb.*, Réunion du 1<sup>er</sup> février 1951, in : *Ces Annales*, 1951, **80**, 508.
- [25] J. D. ARONSON. *Am. J. Publ. Health*, 1950, **40**, 533-544.
- [26] K. A. JENSEN. *Acta Tuberc. Scand.*, 1946, **20**, 1. — J. HOLM. *Publ. Health Rep.*, 1946, **61**, 1298.
- [27] A. CALMETTE et C. GUÉRIN. *Technique des cultures du BCG*, Paris, MARETHEUX, 1927, 13 (*Institut Pasteur. Laboratoires de la Tuberculose*).
- [28] HYGÉ. *Acta Tuberc. Scand.*, 1949, **23**, 153-155.
- [29] J. HEIMBECK. *Semaine des Hôp.*, 1949, **25**, 771-775.
- [30] H. ANDERSON et H. BELFRAGE. *Acta Paediat.*, 1939, **26**, 1.
- [31] A. WALLGREN. *Bull. Off. Hyg. publ.*, 1946, **38**, 1041-1047. — *Semaine Hôp. Paris*, 1946, **22**, 369-372.
- [32] J. D. ARONSON et C. E. PALMER. *Publ. Health Rep.*, Washington, 1946, **61**, 802-820. — J. D. ARONSON. *I<sup>er</sup> Congrès Intern. BCG*, Paris, 1948, 196.
- [33] FERGUSON. *Am. Rev. Tub.*, 1946, **54**, 325.
- [34] AMERICAN TRUDEAU SOCIETY. *Am. Rev. Tub.*, 1948, **57**, 543-545.
- [35] K. BIRKHAUG. Introduction au livre de K. Neville Irvine [1].
- [36] R. J. ANDERSON. *Publ. Health Rep.*, 1950, **65**, 963.
- [37] J. A. MYERS. *Am. Rev. Tub.*, 1948, **57**, 95-113 (Seminar on BCG).
- [38] S. A. SLATER. *Am. Rev. Tub.*, 1948, **57**, 107-109 (Seminar on BCG).
- [39] J. D. ANDERSON et PALMER. *J. A. M. A.*, 1950, **43**, 1048.
- [40] F. VAN DEINSE et F. SÉNÉCHAL. *Tubercle*, 1950, **31**, 185-189.
- [41] Mentionnée par G. RAMON, *loc. cit.* p. 142.
- [42] A. WALLGREN. *Bull. Off. Hyg. Publ.*, 1946, **38**, 1041-1047. — *Semaine Hôp. Paris*, 1946, **22**, 369-372.
- [43] TORTORELLA. *I<sup>er</sup> Congrès Intern. BCG*, Paris, 1948, 323.
- [44] A. ASCOLI. *I<sup>er</sup> Congrès Intern. BCG*, Paris, 1948, Section III, 152-157.
- [45] J. DESSOUTER. Communication présentée par le professeur BRESSOU. *I<sup>er</sup> Congrès Intern. du BCG*, Paris, 1948, 157-160.
- [46] F. GERLACH. *I<sup>er</sup> Congrès Intern. BCG*, Paris, 1948, Section III, 165-170.
- [47] G. GIRARD. *I<sup>er</sup> Congrès Intern. BCG*, Paris, 1948, Section III, 161 et 161-162.
- [48] P. HAUTCŒUR. *I<sup>er</sup> Congrès Intern. BCG*, Paris, 1948. Section III, 171-175.
- [49] A. RICHART. *I<sup>er</sup> Congrès Intern. BCG*, Paris, 1948, Section III, 175-176.

- [50] C. BRESSOU. *I<sup>er</sup> Congrès Intern. BCG*, Paris, 1948, Section III, 163.
- [51] E. GRAEUB. *I<sup>er</sup> Congrès Intern. BCG*, Paris, 1948, Section III, 163-164.
- [52] TH. MADSEN, J. HOLM et K. A. JENSEN. *Acta Tuberc. Scand.*, 1942, *Suppl. 6*, 39.
- [53] J. A. YOUNG et J. S. PATERSON. *J. Hyg.*, 1949, **47**, 39-73.
- [54] A. Q. WELLS. *Privy Council. Medical Research Council, Special Report Series*, London, 1946, n° 259, 1-42.

## LE PHÉNOMÈNE DE L'HEMOLYSE CONDITIONNÉE DANS LA TUBERCULOSE

par CH. GERNEZ-RIEUX et A. TACQUET (\*).

(Institut Pasteur de Lille.)

Les globules rouges de mouton sensibilisés par différents extraits bacillaires peuvent être agglutinés par les antisérums correspondants, inactifs [1, 2, 3, 4].

Il était intéressant d'étudier le comportement de cette réaction en présence d'alexine. Des travaux récents ont montré que, dans de telles conditions d'expérience, on peut observer une hémolyse spécifique.

Muniz [5] a, le premier, constaté ce fait et souligné la nature polysaccharidique des extraits de *Schizotrypanum cruzi* qui donnent lieu à la réaction. Il a appliqué cette réaction d'« hémolyse conditionnée » au diagnostic de la trypanosomiase américaine.

Ce même phénomène avait déjà attiré l'attention de G. Middlebrook [6] qui, utilisant des sérums humains non chauffés pour l'étude de l'hémagglutination dans la tuberculose, constata cette hémolyse et en déduisit une « modification hémolytique du test d'hémagglutination ».

Par ailleurs, des faits analogues ont été rapportés par Fisher et Keogh [7] et par Adler [8].

Enfin, Thomas et Mennie [9, 10] ont montré que ce phénomène d'ordre très général est applicable en particulier au diagnostic de la tuberculose, de la gonococcie, de la fièvre typhoïde (« polysaccharide lysis test ») : il semble provoqué par la fraction polysaccharidique des antigènes.

Nous avons entrepris l'étude systématique de ce phénomène au cours de la tuberculose animale expérimentale et de la tuberculose humaine. Ce sont ces recherches que nous exposons ici. Nous aborderons d'abord l'étude de la technique de la réaction d'hémolyse, telle que nous l'avons utilisée, puis les modifications

(\*) Société française de Microbiologie, séance du 5 avril 1951.



apportées à cette technique ; nous exposerons enfin les résultats obtenus, chez l'animal et chez les sujets humains, par l'emploi de la tuberculine I. P. 48.

Nous adopterons, dans cet article, le terme « d'hémolyse conditionnée » qui a été suggéré par Muniz.

### I. — Technique utilisée pour l'étude du phénomène d'hémolyse conditionnée.

Dans la réalisation du test d'hémolyse, 4 éléments interviennent :

- 1° Le sérum à éprouver ;
- 2° Les hématies de mouton ;
- 3° L'antigène ;
- 4° L'alexine de cobaye fraîchement recueillie.

1° PRÉPARATION DES SÉRUMS. — Cette préparation est analogue à celle précédemment décrite pour le test d'héماغglutination [2]. Elle comporte :

L'inactivation du complément par chauffage, une demi-heure à 56° ;

La saturation des agglutinines naturelles anti-mouton.

2° SENSIBILISATION DES GLOBULES DE MOUTON. — Les globules, conservés en solution d'Alsever, sont lavés à trois reprises avant l'emploi : on utilise le culot de globules lavés. La sensibilisation peut être effectuée avec différents antigènes : mais nous avons surtout utilisé la tuberculine I. P. 48, non lyophilisée, qui nous a été spécialement fournie par le D<sup>r</sup> Bretey, chef du Service de la Tuberculose à l'Institut Pasteur de Paris. Nous procédons de la façon suivante :

0,1 ml du culot de globules rouges lavés sont mis en présence de tuberculine I. P. 48 dissoute dans 1 cm<sup>3</sup> de solution tamponnée. La sensibilisation est réalisée au bain-marie à 37° pendant deux heures, avec une agitation tous les quarts d'heure. Les globules sont ensuite lavés deux fois et remis en suspension dans 20 ml de solution tamponnée, soit une concentration globulaire de 0,5 p. 100.

3° RÉALISATION DE LA RÉACTION. — Le sérum, inactivé et saturé, est réparti, sous le volume de 0,4 ml, dans des tubes à hémolyse à des dilutions croissantes de 2 en 2.

L'alexine fraîche de cobaye, diluée au tiers et saturée à deux

reprises à + 4° par les hématies de mouton non sensibilisées, est ajoutée à la dose de 0,05 ml dans chaque tube. Cette dose correspond à la quantité de complément nécessaire pour réaliser l'hémolyse complète de 1 ml de globules de mouton, en suspension à 0,5 p. 100, en présence d'un excès de sérum hémolytique anti-mouton. Il est, en effet, utile de titrer l'alexine avant l'emploi.

On apporte, enfin, les globules rouges de mouton sensibilisés, à la dose de 0,4 ml.

Trois témoins sont indispensables :

a) Un témoin solution tamponnée et hématies sensibilisées ;  
b) Un témoin sérum à tester, hématies non sensibilisées, et alexine saturée. Ce témoin est nécessaire pour s'assurer que le complément saturé n'a pas de pouvoir hémolytique appréciable sur les globules rouges de mouton.

c) Un témoin hématies sensibilisées et alexine pour vérifier que cette alexine ne contient pas d'anticorps susceptibles de réagir avec les globules rouges sensibilisés.

L'ensemble est incubé pendant deux heures à 37°, et la réaction est lue en ne tenant compte que des hémolyses nettes, c'est-à-dire de l'hémolyse totale et de l'hémolyse presque totale (léger culot d'hématies à peine perceptible).

Dès la première heure, l'hémolyse est souvent obtenue, mais elle n'est complète qu'au bout de deux heures.

Nous n'avons jamais observé, jusqu'à présent, d'hémolyse dans les témoins b) et c).

## II. — Modifications apportées à la technique précédente.

1° EMPLOI DE GLOBULES ROUGES HUMAINS. — Middlebrook [6] a constaté que l'hémolyse est possible par l'emploi de globules humains homologues sensibilisés par la tuberculine et mis en présence de sérums humains *non chauffés*.

Nous avons cherché à utiliser, avec des sérums animaux *chauffés* et saturés, les hématies humaines du groupe O, et

TABEAU I.

SÉRUMS EXPÉRIMENTAUX	ALEXINE de cobay non diluée	ALEXINE de cobaye diluée au 1/3
Sérum de lapin neuf, n° 3765. . . . .	1/4	0
Sérum de lapin anti-bacilles bovins, n° 3794.	1/512	1/16

l'alexine de cobaye. Le tableau ci-dessous montre que l'alexine de cobaye, non diluée (dose de 0,05 ml), peut déterminer l'hémolyse en présence de sérums tuberculeux particulièrement actifs ; les taux sont beaucoup plus faibles en présence d'alexine diluée au tiers (dose de 0,05 ml).

2° ETUDES DE DIFFÉRENTES TUBERCULINES COMME ANTIGÈNE SENSIBILISANT. — Nous avons effectué, sur 8 sérums d'animaux — 4 sérums de lapins non inoculés et 4 sérums de lapins expérimentalement infectés par des bacilles tuberculeux — des réactions comparatives à l'aide de :

Cinq lots différents de tuberculine I. P. 48 ;

La tuberculine précipitée à 1 p. 100 ;

La « Special old tuberculin Lederle » (4 × International standard).

Les résultats rassemblés dans le tableau II montrent : que les 5 tuberculines I. P. 48 étudiées présentent une activité très différente ; que le taux limite de la réaction augmente avec la

TA

TUBERC

Doses pour 0,1 ml de globules	N° 17			N° 63			N° 65		
	0,06 mg	0,3 mg	0,6 mg	0,06 mg	0,3 mg	0,6 mg	0,06 mg	0,3 mg	0,6 mg
Sérum n° 3763.									
Lapin neuf . . . . .	0	1/8	1/32	0	0	1/16	0	1/8	1/4
Sérum n° 3764.									
Lapin neuf . . . . .	0	0	1/4	0	0	1/8	0	0	
Sérum n° 3765.									
Lapin neuf . . . . .	1/2	1/8	1/8	0	0	1/16	0	1/8	1/8
Sérum n° 3660.									
Lapin neuf . . . . .	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sérum n° 3749.									
Anti-BCG . . . . .	1/8 192	1/16 384	1/32 678	1/4 096	1/4 096	1/8 192	1/4 096	1/16 384	1/32 678
Sérum n° 3816.									
Anti-H <sub>37</sub> Rv . . . . .	1/128	1/1 024	1/1 024	1/128	1/256	1/512	1/128	1/256	1/512
Sérum n° 3678.									
Anti-bacilles bovins .	1/64	1/256	1/256	1/64	1/128	1/128	1/64	1/256	1/512
Sérum n° 3794.									
Anti-bacilles bovins .	1/1 024	1/2 048	1/4 096	1/64	1/256	1/256	1/64	1/512	1/1 024



dose de tuberculine utilisée ; que, pour des doses importantes, l'hémolyse peut se manifester avec les sérums des animaux neufs ; que la tuberculine précipitée à 1 p. 100 et la tuberculine Lederle donnent, en général, aux doses employées, des taux d'hémolyse moins élevés que la tuberculine I. P. 48.

3° FRACTIONS POLYSACCHARIDIQUES ET PROTÉINIQUES DE LA TUBERCULINE I. P. 48. — Il nous a paru intéressant de rechercher si le phénomène de l'hémolyse conditionnée est lié à la sensibilisation des globules par une fraction polysaccharidique de l'antigène. Nous avons effectué, par conséquent, sur les sérums ci-dessus, des réactions comparatives avec une fraction riche en polysaccharides et une fraction riche en protéines, qui nous ont été fournies par le D<sup>r</sup> Bretey.

Le tableau III résume les résultats obtenus.

La fraction polysaccharidique semble donc être la partie antigénique active dans la réaction d'hémolyse conditionnée. La fraction protéinique se révèle totalement inactive, avec la technique

						TUBERCULINE PRÉCIPITÉE à 1 p. 100			OLD TUBERCULIN LEDERLE (1/12)	
N° 66			N° 68							
g	0,3 mg	0,6 mg	0,06 mg	0,3 mg	0 6 mg	0,05 ml	0,10 ml	0,20 ml	2 ml	4 ml
	1/8	1/32	0	1/4	1/16	0	0	0	0	0
	0	0	0	1/8	1/8	0	0	0	0	0
	1/4	1/8	0	1/8	1/16	0	0	0	0	0
	0	1/2	0	0	0	0	0	0	0	0
12	1/16 384	1/16 384	1/2 048	1/16 384	1/16 384	1/2 048	1/4 096	1/8 192	1/4 096	1/4 096
	1/512	1/512	1/128	1/256	1/256	0	1/16	1/64	1/128	1/256
	1/256	1/256	1/16	1/128	1/128	0	1/8	1/16	1/16	1/32
	1/256	1/512	1/128	1/512	1/512	1/64	1/128	1/512	1/512	1/512

TABLEAU III.

Doses en mg pour 0,1 ml de globules	FRACTION polysaccharidique		FRACTION protéinique
	0,03	0,06	0,06
Sérum n° 3763.			
Lapin neuf . . . . .	1/32	1/32	0
Sérum n° 3764.			
Lapin neuf . . . . .	0	1/32	0
Sérum n° 3765.			
Lapin neuf . . . . .	0	1/16	0
Sérum n° 3660.			
Lapin neuf . . . . .	0	1/16	0
Sérum n° 3749.			
Anti-BCG . . . . .	1/16 384	1/16 384	0
Sérum n° 3816.			
Anti H <sub>37</sub> Rv . . . . .	1/1 024	1/2 048	0
Sérum n° 3678.			
Anti-bacilles bovins .	1/2 048	1/4 096	0
Sérum n° 3794.			
Anti-bacilles bovins .	1/2 048	1/4 096	0

décrite ci-dessus. Ces résultats sont superposables à ceux que nous avons observés au cours de nos recherches sur l'hémagglutination [3]. En ce qui concerne cette dernière, Boyden [41] a récemment obtenu des taux élevés en utilisant la sensibilisation par l'acide tannique puis par la P. P. D. Mais il importe de souligner que la P. P. D. utilisée (Weybridge) contenait 5 p. 100 de polysaccharides.

### III. — Résultats obtenus chez l'animal expérimentalement infecté, et chez l'homme.

1° CHEZ L'ANIMAL. — Nous avons étudié les taux d'hémolyse après inoculation expérimentale de bacilles tuberculeux virulents ou non virulents. Le tableau IV indique ces taux, comparative-ment aux taux obtenus avec l'hémagglutination. On notera l'existence, pour certains sérums, de discordances importantes entre les taux d'hémolyse et d'agglutination. Middlebrook attribue ce fait à des différences qualitatives dans les anticorps intéressés dans les deux réactions.

TABLEAU IV.

SÉRUMS expérimentaux	AVANT inoculation		APRÈS inoculation					
			6 <sup>e</sup> jour		15 <sup>e</sup> jour		30 <sup>e</sup> jour	
	Ag	Hm	Ag	Hm	Ag	Hm	Ag	Hm
Sérum 71. Anti-bacilles bovins .	0	0	1/64	1/256	1/128	1/512	Mort.	
Sérum 78. Anti-bacilles bovins .	0	0	1/256	1/4 024	1/256	1/8 192	Mort.	
Sérum 27. Anti-H <sub>37</sub> Rv . . . . .	1/4	0	1/64	1/512	1/64	1/1 024	1/128	1/2 048
Sérum 28. Anti-H <sub>37</sub> Rv . . . . .	0	0	1/64	0	1/128	1/256	1/128	1/2 048
Sérum 29. Anti-H <sub>37</sub> Rv . . . . .	1/2	0	1/32	1/8	1/64	1/128	1/64	1/8 192
Sérum 143. Anti-BCG . . . . .	0	0	1/256	1/512	1/2 048	1/1 024	1/2 048	1/16 384

Ag, hémagglutination; Hm, hémolyse.

2° CHEZ L'HOMME. — Nous avons appliqué le test d'hémolyse conditionnée, tel que nous l'avons décrit page 2, à l'étude des sérums de 121 sujets cliniquement indemnes de tuberculose, et de 208 sérums de sujets présentant une tuberculose pulmonaire active. Nous n'apporterons, ici, que le résumé de nos premières constatations :

Les sérums de sujets indemnes de tuberculose ne donnent, dans 87 p. 100 des cas, aucune hémolyse ou des taux d'hémolyse inférieurs à la dilution de sérum de 1/16. Chez les sujets tuberculeux, au contraire, nous avons observé, dans 76 p. 100 des cas, une hémolyse dépassant le taux de 1/16 et s'élevant, parfois, à des taux de dilution de 1/128 ou 1/256.

Les recherches précédentes montrent que les réactions d'hémolyse ou d'hémagglutination ne sont pas rigoureusement spécifiques, dans les conditions techniques décrites ci-dessus et avec l'emploi de la tuberculine I. P. 48 aux doses indiquées. Sievers, Ulstrup et Winblad [12] ont constaté, à propos de l'hémagglutination, que la saturation à six reprises à l'aide de globules rouges de mouton permet d'obtenir une spécificité plus grande. Nos expériences effectuées sur des sérums humains ne nous ont



pas permis de vérifier ce fait en ce qui concerne l'hémolyse conditionnée.

Muniz [13] a également attiré l'attention sur l'existence, dans le sérum de certains sujets sains, d'anticorps hétérophiles capables de réagir avec les extraits antigéniques de *S. cruzi*. Il effectue l'adsorption de ces anticorps non spécifiques par des extraits de rein de cobayes et de globules de bœuf. Nous avons procédé à la saturation des sérums donnant des réactions faussement positives à l'aide de globules de mouton, d'extraits de rein de cobaye ou de globules de bœuf. Ces saturations n'ont pas modifié, de façon sensible, les taux d'hémolyse.

#### CONCLUSIONS.

1° Les globules rouges de mouton sensibilisés par la tuberculine sont hémolysés, en présence d'alexine, par les sérums inactifs d'animaux infectés expérimentalement par les bacilles tuberculeux, ou de sujets humains tuberculeux.

2° Les différentes tuberculines étudiées présentent une activité sensibilisante très inégale.

3° La fraction polysaccharidique de la tuberculine semble être la partie antigénique active dans la réaction d'hémolyse conditionnée.

4° On note fréquemment des divergences appréciables entre les taux d'hémagglutination et les taux d'hémolyse.

5° La réaction d'hémolyse conditionnée est susceptible d'application au diagnostic de la tuberculose humaine active ; mais on peut l'observer avec les sérums de sujets indemnes de tuberculose cliniquement décelable.

6° Les recherches ci-dessus, et celles que nous poursuivons, ont pour but de préciser les conditions d'apparition du phénomène.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements à M. le Dr Bretey, Chef du Service de la Tuberculose à l'Institut Pasteur de Paris, qui a bien voulu nous confier les différents échantillons de tuberculine I. P. 48 utilisés pour ces recherches.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. MIDDLEBROOK et R. J. DUBOS. *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 521.
- [2] Ch. GERNEZ-RIEUX et A. TACQUET. *Bull. Acad. Méd.*, 1949, **133**, 556.
- [3] Ch. GERNEZ-RIEUX et A. TACQUET. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1950, **3**, 1.
- [4] R. SOHIER, J. JUILLARD et I. TRIMBERGER. *Ces Annales*, 1950, **78**, 283.
- [5] J. MUNIZ. *O Hospital*, 1950, **37**, 199.
- [6] G. MIDDLEBROOK. *J. Clin. Investigation*, 1950, **29**, 1480.

- [7] S. FISHER et E. V. KEOGH. *Nature*, 1950, **165**, 248.
- [8] F. L. ADLER. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **74**, 561.
- [9] J. C. THOMAS et A. T. MENNIE. *South Afric. Med. J.*, 1950, **24**, 897.
- [10] J. C. THOMAS et A. T. MENNIE. *Lancet*, 1950, **259**, 745.
- [11] St. V. BOYDEN. *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 107.
- [12] O. SIEVERS, J. ULSTRUP et S. WINBLAD. *Nordisk Medicin*, 1950, **43**, 667.
- [13] J. MUNIZ et M. C. F. DOS SANTOS. *O Hospital*, 1950, **38**, 163.

## ACTION TUBERCULOSTATIQUE DE LA VIOMYCINE *IN VITRO* ET *IN VIVO*

par Ch. GERNEZ-RIEUX, A. TACQUET et M<sup>lle</sup> C. CHENET (\*).

(Institut Pasteur de Lille.)

La viomycine a fait l'objet des études expérimentales récentes de Finlay [1], Ehrlich [2], Hobby [3], Youmans [4], Steenken [5], Karlson [6] et Halley [7].

Nous avons vérifié l'activité de ce nouvel antibiotique, *in vitro* et *in vivo*, sur différentes souches de *Mycobacterium tuberculosis*.

1° SENSIBILITÉ DES BACILLES A CET ANTIBIOTIQUE : ETUDES *in vitro*. — a) *Procédés de dosage*. — Cinq milieux différents ont été utilisés :

Le milieu liquide de Dubos au Tween 80 (500 mg par litre) et fraction V (0,5 p. 100) ;

Le milieu gélosé de Dubos au Tween 80 (100 mg par litre) et fraction V (0,5 p. 100) ;

Le milieu liquide à l'acide oléique (50 mg par litre) et fraction V (0,5 p. 100) ;

Le milieu liquide de Dubos sans Tween avec fraction V (0,5 p. 100) ;

Le milieu de Loewenstein-Jensen, la viomycine étant incorporée avant coagulation du milieu, ou déposée à la surface du milieu coagulé antérieurement, selon la technique préconisée par Coletsos et Boisvert [8].

Chaque souche étudiée a été ensemencée sur une série de 11 tubes contenant des doses croissantes : 0,25, 0,50, 1, 1,5, 2,5, 5, 10, 15, 25, 50  $\mu$ g de viomycine-base par millilitre de milieu ; le dernier tube, sans antibiotique, sert de témoin.

b) *Sensibilité des différentes souches de bacilles tuberculeux*. — Cinq souches de bacilles humains ont été étudiées sur ces milieux :

La souche H<sub>37</sub> Rv, la souche M, la souche 38817, toutes sensibles à 1  $\mu$ g de Streptomycine par millilitre ;

La souche G et la souche 38673, résistantes à 1 000  $\mu$ g de Streptomycine.

(\*) Société française de Microbiologie, séance du 7 juin 1951.



Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau I.

TABLEAU I. — Sensibilité *in vitro* des souches de bacilles tuberculeux sur différents milieux de culture : lecture effectuée le douzième jour.

SOUCHES	MILIEU de Dubos liquide (Tween-Fraction V)	MILIEU de Dubos solide (Tween-Fraction V)	MILIEU de Dubos liquide à l'acide oléique et fraction V	MILIEU de Dubos liquide sans Tween avec fraction V	MILIEU de Löwenstein coagulé Viomycine en surface	MILIEU de Löwenstein et viomycine coagulation ultérieure
H <sub>37</sub> Rv. Streptomycino-sensible à 1 µg par ml. . . . .	5 (1)	5 (1)	5	5	15	25
M. Streptomycino-sensible à 1 µg par ml. . . . .	2,5	2,5	2,5	2,5	15	50
38847. Streptomycino-sensible à 1 µg par ml. . . . .	2,5	2,5	2,5	2,5	25	50
G. Streptomycino-résistante à 1 000 µg par ml. . .	2,5	2,5	2,5	2,5	15	50
38673. Streptomycino-résistante à 1 000 µg par ml. . .	2,5	2,5	2,5	2,5	15	50

(1) Les nombres expriment la quantité minima de µg par ml de viomycine-base qui n'inhibe pas le développement de la culture en 12 jours.

En résumé : 1° Les souches que nous avons étudiées se sont montrées également sensibles à la viomycine sur les milieux de Dubos au Tween et fraction V, liquide ou solide, sur le milieu à l'acide oléique fraction V et sur le milieu sans Tween, avec fraction V. Ces milieux sont excellents pour la recherche de la viomycino-sensibilité. Celle-ci n'est pas modifiée par la présence de Tween. Par contre, en milieu de Löwenstein, les taux limites sont plus élevés ; la relation de concordance proposée par A. Meyer et R. Galland [9] pour les dosages de streptomycino-sensibilité sur ce milieu pourrait, sans doute, leur être appliquée.

2° Les 4 souches étudiées se sont révélées sensibles à 2,5 µg par millilitre de viomycine ; H<sub>37</sub> Rv est sensible à 5 µg par millilitre. Ces résultats concordent avec ceux obtenus le douzième jour par Finlay sur milieu liquide au Tween-albumine. Enfin, une souche BCG s'est montrée sensible à 1,5 µg par milli-

litre de viomycine-base sur milieu liquide de Dubos Tween et fraction V.

2° EXPÉRIMENTATION SUR LE COBAYE. — Nous avons utilisé la méthode d'inoculation intradermique préconisée par Et. Burnet et Ch. Mantoux [40], et que nous avons proposée pour l'étude de la streptomycino-sensibilité *in vivo* [41].

15 cobayes d'un poids moyen de 700 g sont inoculés, par voie intradermique, avec 0,2 ml d'une culture homogène (correspondant environ à 0,05 mg de bacilles secs), des 3 souches sensibles : H<sub>37</sub>Rv, souche M, souche 38817, et des 2 souches résistantes à 1 000 µg de Streptomycine : souche 38673 et souche G.

5 cobayes non traités servent de témoins ;

5 cobayes reçoivent, dès le lendemain de l'inoculation, 10 000 unités de Streptomycine en deux injections chaque jour ;

5 cobayes sont traités le lendemain de l'inoculation par 20 mg de viomycine (sulfate) répartis en deux injections chaque jour (doses préconisées par Karlson et Gainer [6]). Le traitement antibiotique est prolongé pendant cinquante-huit jours.

a) *Action sur les lésions locales.* — Les animaux non traités développent tous, au point d'injection, entre le huitième et le quatorzième jour, des abcès volumineux, à centre nécrotique, suivis d'une ulcération profonde. Les cobayes traités par la Streptomycine montrent, au point d'inoculation des souches streptomycino-résistantes, des ulcérations profondes, tandis que les souches streptomycino-sensibles ne produisent que des lésions limitées. Cette distinction devient extrêmement nette à partir du quatorzième jour, époque à laquelle apparaît l'allergie tuberculinique. Au vingt-quatrième jour, les points d'inoculation des souches streptomycino-résistantes sont le siège d'ulcérations profondes et étendues, tandis que les lésions locales provoquées par les souches streptomycino-sensibles sont cicatrisées.

Par contre, chez les animaux traités par la viomycine, les lésions sont toutes identiques, qu'elles soient consécutives à l'injection de souches streptomycino-résistantes ou de souches streptomycino-sensibles.

La viomycine, appliquée dès le moment de l'inoculation, n'empêche pas la formation de l'abcès local et son ulcération. Mais la lésion est rapidement circonscrite et les phénomènes inflammatoires s'atténuent vers le vingtième jour. Dès le trentième jour, la cicatrisation s'établit, qu'il s'agisse de lésions provoquées par des souches streptomycino-résistantes ou streptomycino-sensibles ; mais il persiste, jusqu'à la fin du traitement, un petit abcès sous-cutané circonscrit.

En résumé, ces faits confirment, *in vivo*, l'égal pouvoir tuber-

culostatique de la viomycine, constaté *in vitro*, sur les souches streptomycino-résistantes ou non.

b) *Action sur l'infection tuberculeuse générale.* — La perte de poids chez les animaux précédents a été aussi importante (en moyenne 140 g) dans les 3 lots, traités ou non traités.

La moyenne des survies a été de trente jours chez les cobayes témoins et chez ceux traités par la Streptomycine.

Parmi les cobayes traités par la viomycine, 2 sont morts le trente-quatrième jour : l'un présentait une tuberculose généralisée, avec nombreux tubercules dans le foie, la rate et les poumons ; l'autre montrait un foie très volumineux avec nombreux tubercules et foyers caséux, une rate augmentée de volume avec 6 tubercules, des lésions discrètes et localisées du poumon gauche, une adénopathie inguinale non caséuse. Trois cobayes restaient vivants à la fin du traitement, le cinquante-huitième jour. Parmi ces derniers, 2 sont morts le soixante-huitième jour : ils présentaient des lésions de tuberculose généralisée. Le cobaye survivant a été sacrifié le soixante-dixième jour : l'examen a montré l'absence de lésions pulmonaires macroscopiques, mais quelques tubercules hépatiques et une rate très volumineuse, avec nombreux tubercules et foyers de caséification. Il existait des adénopathies inguinales bilatérales à centre caséux, des adénopathies mésentériques et médiastinales non ramollies.

*En résumé*, la viomycine, utilisée aux doses ci-dessus recommandées par Karlson, n'a permis la survie que de 3 cobayes sur 5.

Cette protection n'a été que partielle et momentanée : 2 animaux sont morts dix jours après la fin du traitement ; le cinquième a été sacrifié le soixante-dixième jour.

Une seconde expérience, réalisée sur un autre lot de 15 cobayes, inoculés par voie intradermique avec une dose vingt fois plus faible de bacilles, a confirmé ces premières constatations. Nous l'exposerons avec plus de détails par ailleurs [12].

Trois souches de bacilles (souche sensible H<sub>37</sub> Rv, souche streptomycino-résistante 38673 et souche streptomycino-résistante G) ont pu être réisolées à partir du pus des abcès, le vingtième jour du traitement, par la viomycine. L'étude de leur sensibilité vis-à-vis de la viomycine et de la Streptomycine a fourni les résultats résumés dans le tableau II.

D'autres souches ont d'ailleurs été isolées des lésions cutanées au quarante-troisième jour du traitement par la viomycine (1 souche résistante, 38673, et 2 souches sensibles, M et 38817).

*En résumé*, nous n'avons pas constaté l'apparition de viomycino-résistance ni de streptomycino-résistance *in vivo* après passage sur le cobaye traité. On sait que, par contre, à la suite de 8 trans-



TABLEAU II. — Sensibilité à la Viomycine et à la Streptomycine, avant et après passage chez le cobaye traité par le premier de ces antibiotiques.

SOUCHES réisolées le 20 <sup>e</sup> jour	AVANT PASSAGE chez le cobaye		APRÈS PASSAGE chez le cobaye traité par la Viomycine	
	Viomycine	Streptomycine	Viomycine	Streptomycine
H <sub>37</sub> Rv . . . . .	5 (1)	0,5 (1)	2,5	0,5
38673 . . . . .	2,5	1 000	2,5	1 000
Souche G . . . . .	2,5	1 000	2,5	1 000

(1) Les nombres expriment la quantité minima de µg par ml d'antibiotique qui n'inhibe pas le développement de la culture en 12 jours.

ferts en milieu liquide, Steenken a pu obtenir *in vitro* une souche de bacilles tuberculeux hautement résistante à la viomycine.

c) *Toxicité pour l'animal*. — Un lot de 5 cobayes neufs a reçu chaque jour 20 mg de viomycine en deux injections. Nous n'avons constaté aucune action toxique. Après cinquante jours de traitement, les animaux ont conservé le même poids. L'autopsie n'a pas montré de foyer de nécrose aux points d'injection. L'examen histologique n'a révélé aucune lésion viscérale caractéristique.

Des constatations identiques ont pu être faites chez des souris suisses de type Rockefeller traitées pendant vingt jours avec une dose de 175 mg par kilogramme et par jour de viomycine.

d) *Réactions allergiques*. — L'allergie, après intradermo-réaction à la tuberculine brute, diluée au 1/10, s'est révélée faible ou nulle, le quatorzième jour, chez les cobayes inoculés et non traités ; elle était alors, au contraire, très nette, et se manifestait sous la forme de réactions nécrotiques, chez les animaux traités par la Streptomycine ou la viomycine.

*En conclusion* : 1° La viomycine s'est montrée douée d'un fort pouvoir bactériostatique, *in vitro*, sur les souches de *Mycobacterium tuberculosis*, streptomycino-sensibles ou streptomycino-résistantes, que nous avons éprouvées.

2° Les milieux synthétiques décrits par Dubos conviennent parfaitement pour le dosage *in vitro* de ce pouvoir.

3° La méthode *in vivo* par inoculation intradermique chez le cobaye peut être appliquée au titrage de la viomycino-sensibilité des souches de bacilles tuberculeux.

4° La viomycine n'exerce *in vivo*, vis-à-vis de *Mycobacterium tuberculosis*, qu'une action bactériostatique ; les lésions cutanées expérimentales renferment encore des bacilles vivants au quarante-

troisième jour du traitement ; l'infection tuberculeuse expérimentale, momentanément ralentie par l'antibiotique, reprend son évolution après cessation du traitement.

5° Nous n'avons pas constaté, après vingt jours de traitement, de modifications de la viomycino-sensibilité des souches injectées au cobaye.

6° Aucune action toxique n'a été observée, chez le cobaye, aux doses utilisées.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. C. FINLAY, G. L. HOBBY, F. HOCHSTEIN, T. M. LEES, T. F. LENERT, J. A. MEANS, S. Y. P'AN, P. P. REGNA, J. B. ROUTIEN, B. A. SOBIN, K. B. TATE et J. H. KANE. Viomycin, a new antibiotic active against *Mycobacteria*. *Am. Rev. Tub.*, 1951, **63**, 1.
- [2] J. EHRLICH, R. M. SMITH, M. A. PENNER, L. E. ANDERSON et A. C. BRATTON JR. Antimicrobial activity of *Streptomyces* Floridae and of Viomycin. *Am. Rev. Tub.*, 1951, **63**, 7.
- [3] G. L. HOBBY, T. F. LENERT, M. DONIKIAN et D. PIKULA. The activity of Viomycin against *Mycobacterium tuberculosis* and other microorganisms *in vitro* and *in vivo*. *Am. Rev. Tub.*, 1951, **63**, 17.
- [4] G. P. YOUMANS et A. STEWART-YOUMANS. The effect of Viomycin *in vitro* and *in vivo* on *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. Rev. Tub.*, 1951, **63**, 25.
- [5] W. STEENKEN Jr et E. WOLINSKY. Viomycin in Experimental Tuberculosis. *Am. Rev. Tub.*, 1951, **63**, 30.
- [6] A. G. KARLSON et J. H. GAINER. The effect of Viomycin in Tuberculosis of Guinea Pigs, including *in vitro* Effects against Tubercle Bacilli Resistant to certain Drugs. *Am. Rev. Tub.*, 1951, **63**, 36.
- [7] S. Y. P'AN, T. V. HALLEY, J. C. REILLY et A. M. PEKICH. Viomycin. Acute and Chronic Toxicity in Experimental Animals. *Am. Rev. Tub.*, 1951, **63**, 44.
- [8] P. J. COLETSOS et H. BOISVERT. *Rev. Tub.*, 1949, **43**, 344.
- [9] A. MEYER et R. GALLAND. *Rev. Tub.*, 1950, **44**, 124.
- [10] ET. BURNET et CH. MANTOUX. *C. R. Soc. Biol.*, 1912, **73**, 384.
- [11] JULIANELLE et C. W. WIEGHARD. *J. exp. Med.*, 1935, **62**, 23, 326.
- [12] CH. GERNEZ-RIEUX, A. TACQUET et M<sup>lle</sup> CHENET. *Ann. Inst. Pasteur de Lille*, 1951, **4** (à paraître).

**ÉTUDE QUANTITATIVE  
DE L'ACTIVITÉ GRANULOPEXIQUE  
DU SYSTÈME RÉTICULO-ENDOTHÉLIAL  
PAR L'INJECTION INTRAVEINEUSE D'ENCRE DE CHINE  
CHEZ LES DIVERSES ESPÈCES ANIMALES**

**II. — RELATIONS ENTRE LES MODIFICATIONS  
DE LA COAGULATION DU SANG *in vitro*  
SOUS L'EFFET DE L'INJECTION INTRAVEINEUSE  
DE DOSES CROISSANTES D'ENCRE DE CHINE  
ET SA RÉPARTITION DANS L'ORGANISME**

par G. BIOZZI, B. BENACERRAF, G. MENÈ et B.-N. HALPERN.

(*Laboratoire de Pathologie expérimentale de la Clinique médicale  
propédeutique de l'Hôpital Broussais [M. PASTEUR VALLÉRY-  
RADOT], C. N. R. S. et C. N. R. Italiano.*)

Dans un travail précédent [1] nous avons décrit une méthode permettant l'exploration quantitative de l'activité granulopexique du système réticulo-endothélial basée sur l'injection intraveineuse d'une encre de Chine standard ayant une dispersion, une stabilité et une teneur en carbone connues. Nous avons étudié aussi bien chez le Rat que chez la Souris la cinétique de la disparition des particules de carbone du sang et leur accumulation pondérale dans les organes selon la dose d'encre injectée.

Des résultats tout à fait imprévus ont été observés chez le Rat : ainsi lorsqu'on dépasse la dose de 16 mg de carbone pour 100 g, l'épuration sanguine des particules de carbone se fait beaucoup plus rapidement que pour les doses inférieures, et s'accélère encore avec l'augmentation de la dose. Avec les doses inférieures à 16 mg de carbone pour 100 g, seuls les territoires du foie et de la rate participent à la macrophagie, tandis que pour les doses supérieures on trouve des quantités importantes et



croissantes de carbone dans le poumon et accessoirement dans le rein.

Il y a lieu de souligner que cet effet paradoxal des doses croissantes d'encre de Chine sur la vitesse de l'épuration sanguine s'observe également chez la Souris, mais avec des doses bien plus élevées et d'une manière irrégulière.

Chez cette espèce animale le niveau et la durée du séjour de l'encre dans la circulation sanguine sont proportionnels à la dose, jusqu'à une quantité de carbone qui est sensiblement le double de celle utilisée chez le Rat.

L'objet de cette étude est d'expliquer le mécanisme de cette action paradoxale des doses croissantes d'encre de Chine sur la vitesse de l'épuration sanguine et sa distribution dans les organes. Ainsi qu'il résultera de l'exposé qui suit, cet effet relève de l'action des particules de carbone sur certains facteurs intervenant dans le processus de la coagulation sanguine.

Des travaux précédents réalisés chez le Lapin ont attiré l'attention sur la chute du nombre des plaquettes dans le sang après injection intraveineuse de l'encre de Chine [2, 3]. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que les particules de carbone injectées s'accolent aux plaquettes et que c'est sous cette forme que celles-ci sont retenues dans le poumon. Aucune preuve, cependant, n'a été fournie à l'appui de cette hypothèse.

On peut rapprocher de ces faits l'observation de Midy [4] qui a noté que l'injection intraveineuse d'une suspension de carbone chez la Chauve-souris provoquait, lorsqu'elle était porteuse de parasites intestinaux, à l'endroit de la fixation de ces parasites, des hémorragies pouvant être fatales à l'animal. Cet auteur n'a pas cherché à expliquer ce phénomène curieux.

A notre connaissance, il n'a pas été rapporté dans la littérature d'autres faits sur une modification de la coagulation sanguine produite par l'administration intraveineuse d'encre de Chine.

Les expériences relatées dans ce travail ont pour but d'étudier l'effet de l'injection de doses variées d'encre de Chine sur les taux des plaquettes et du fibrinogène sanguin.

#### TECHNIQUE.

Nos expériences ont été faites sur le Rat blanc, dont le poids variait entre 110 et 140 g, et sur la Souris blanche de poids allant de 17 à 25 g. La même encre commerciale (marque Pélikan) que dans l'étude précédente [4] a été employée dans ces essais. Cette encre contient 80 mg de carbone par centimètre cube et la taille

de ses particules, mesurée au microscope électronique, est d'environ 200 Å.

A partir de cette encre, des dilutions ont été faites dans du sérum physiologique contenant 1 p. 100 de gélatine. Les injections d'encre ont été faites dans la veine caudale de l'animal légèrement anesthésié à l'éther. Les doses de 8, 16 et 48 mg de carbone pour 100 g ont été injectées chez le Rat et les doses de 16 et 48 mg de carbone pour 100 g chez la Souris. Ces mêmes doses ont été employées dans le travail précédent pour l'étude de la granulopexie du système réticulo-endothélial. Des dosages de fibrinogène, des numérations de plaquettes ont été faites avant et après les doses d'encre injectées chez le Rat. Chez la Souris, seules les numérations de plaquettes ont été pratiquées.

Pour ces deux espèces animales, les numérations de plaquettes ont été faites avec la technique suivante : 1 goutte de solution de sulfate de magnésium à 14 p. 100 légèrement colorée avec du bleu de crésyl a été déposée sur le côté latéral de la queue de l'animal préalablement lavée à l'alcool et à l'éther. La veine de la queue a été piquée avec une fine aiguille à travers la goutte de la solution de sulfate de magnésium ; le sang sorti a été mélangé dans la goutte même avec une fine baguette de verre. Le nombre de plaquettes ainsi que celui des globules rouges ont été déterminés dans une microcellule à numération globulaire. Simultanément, une numération de globules rouges par millimètre cube a été faite avec la technique habituelle. Le nombre des plaquettes par millimètre cube de sang a été calculé par rapport au taux de globules rouges. Des témoins faits avec cette méthode ont montré que l'erreur de la technique employée était de  $\pm 10$  p. 100.

Les résultats obtenus sont rapportés comme moyenne des résultats pour chaque groupe d'animaux.

Le fibrinogène a été dosé en tant que fibrine par la méthode pondérale en employant du sang de 2 à 4 Rats pour chaque dosage. La récolte de sang a été faite par ponction du plexus veineux ophtalmique avec la technique décrite dans le travail précédent [4]. Le sang prélevé variait entre 0,5 et 1,5 ml par Rat. Avant d'être saignés, les animaux ont reçu des petites doses d'héparine pour permettre les prélèvements de sang sans perte de fibrinogène. De plus, le sang recueilli a été citraté à raison de 1 ml de citrate à 2,5 p. 100 pour 4 ml de sang. Il a été ensuite centrifugé pendant une demi-heure à 4 000 tours et le plasma a été recueilli. Au plasma citraté et dilué dans vingt fois son volume de sérum physiologique on a ajouté de la thrombine purifiée (thrombase Roussel) en excès. Le tout a été mis à l'étuve à 37° jusqu'à complète coagulation de la fibrine. Celle-ci a été recueillie sur une baguette de verre et lavée à l'eau trois fois, à

l'alcool trois fois et à l'acétone deux fois. Elle a été séchée jusqu'à poids constant. Le taux réel de fibrine par millilitre de plasma a été calculé en tenant compte des dilutions successives et par rapport à l'hématocrite. C'est sous cette forme que les résultats sont présentés.

Après avoir établi la teneur en fibrinogène du sang du Rat normal, nous avons étudié l'influence des injections d'encre de Chine sur les modifications du taux de fibrinogène plasmatique. Nous avons procédé de deux manières : chez les animaux du groupe A nous avons dosé le fibrinogène après disparition de l'encre de la circulation ; chez les animaux du groupe B nous avons fait une première détermination avant l'injection d'encre et une deuxième après la disparition de la circulation des particules de carbone. Chez les animaux de ce deuxième groupe, une correction a été nécessaire pour tenir compte de la soustraction sanguine lors du premier prélèvement. Cette correction a été faite sur la base des modifications de l'hématocrite.

### RÉSULTATS.

A. TENEUR EN FIBRINOGENE DU SANG NORMAL DU RAT. — D'après 5 déterminations portant sur 17 Rats nous avons trouvé que le taux de fibrinogène chez les Rats normaux oscille entre 3,1 et 3,6 mg par millilitre de plasma. On voit que l'écart individuel ne dépasse pas 13 p. 100 (tableau I).

TABLEAU I. — Variabilité du taux de fibrinogène mesuré en tant que fibrine dans le plasma du Rat normal.

NOMBRE DE RATS	FIBRINE mg/cm <sup>3</sup>
2 . . . . .	3,6
4 . . . . .	3,5
4 . . . . .	3,5
3 . . . . .	3,3
4 . . . . .	3,1

B. MODIFICATIONS DU NOMBRE DES PLAQUETTES SANGUINES ET DU TAUX DE FIBRINOGENE SOUS L'EFFET DE L'ENCRE DE CHINE. —

a) *Action sur les plaquettes sanguines.* — Les chiffres rapportés dans le tableau II et la figure 1 montrent que l'injection d'encre de Chine à des doses allant de 16 à 48 mg de carbone pour 100 g cause une chute du nombre des plaquettes du sang qui est proportionnelle à la dose.

b) *Action sur le fibrinogène plasmatique.* — Comme on le voit

d'après le tableau II et la figure 2, la dose de 8 mg de carbone pour 100 g ne modifie pas pratiquement la teneur du sang en fibrinogène.

Avec une dose de 16 mg de carbone pour 100 g, on observe une diminution du fibrinogène plasmatique de l'ordre de 25 à 30 p. 100 environ.

TABLEAU II. — Effet de l'injection intraveineuse de doses croissantes de carbone sur le nombre de plaquettes du sang et sur le taux de fibrinogène plasmatique mesuré en tant que fibrine chez le Rat.

DOSE de carbone injectée en mg pour 100 g	NOMBRE de Rats	FIBRINE		NOMBRE DES PLAQUETTES par millimètre cube	
		Avant l'injection d'encre mg/cm <sup>3</sup>	Après l'injection d'encre mg/cm <sup>3</sup>	Avant l'injection d'encre	Après l'injection d'encre
8	2	3,1	3,7	621 000	642 000
	4		3,2	800 000 680 000	760 000 647 000
16	2	3,3	2,6	652 000	570 000
	3		2,3	561 000	417 000
48	2	3,5	1,6	541 000	201 000
	2		1,3	740 000	258 000
	2		0,5		
	4		1,6		

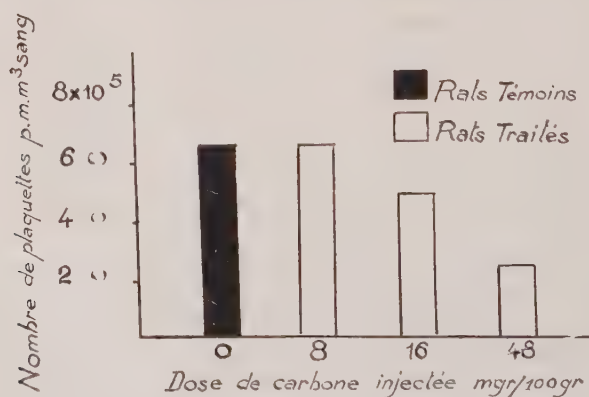


FIG. 1. — Modification du taux des plaquettes sanguines chez le Rat sous l'effet de l'injection intraveineuse de 8, 16 et 48 mg de carbone pour 100 g.



Lorsqu'on injecte une dose d'encre de 48 mg de carbone pour 100 g, on observe alors une diminution considérable du taux de fibrinogène. Cette chute de fibrinogène plasmatique atteint en moyenne 70 p. 100.

C. ACTION D'UNE DOSE ÉLEVÉE DE CARBONE SUR LE TAUX DES PLAQUETTES SANGUINES CHEZ LA SOURIS. — Les résultats présentés dans le tableau III montrent que la dose de 48 mg de carbone

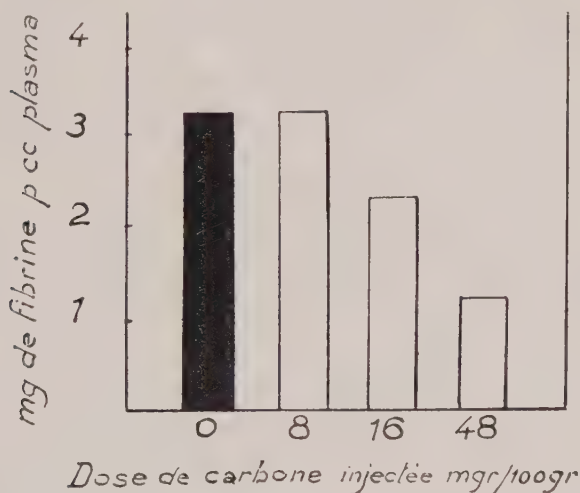


FIG. 2. — Modification du taux de fibrinogène plasmatique chez le Rat sous l'effet de l'injection intraveineuse de 8, 16 et 48 mg de carbone pour 100 g

pour 100 g n'influence pas le nombre des plaquettes dans le sang de la Souris. On se rappelle que cette dose, qui est d'ailleurs la dose limite bien tolérée par l'animal, a causé chez le Rat un effondrement du taux des plaquettes du sang et du fibrinogène plasmatique.

#### DISCUSSION.

Les résultats présentés dans le tableau II montrent clairement que sous l'influence de doses élevées de carbone, il se produit chez le Rat une thrombocytopénie et une diminution du taux de fibrinogène plasmatique.

Pour expliquer la filiation de ces phénomènes, nous proposons l'interprétation suivante : il est probable que les particules de carbone, de dispersion uniforme et de taille d'environ 200 Å,

injectées au Rat à une dose supérieure à 16 mg de carbone pour 100 g, provoquent la libération de thromboplastine à partir des plaquettes ou bien aux dépens d'autres tissus. Cette thromboplastine peut causer la coagulation d'une partie importante du fibrinogène de l'animal. Cette coagulation est en plus favorisée par la surface considérable fournie par les particules de carbone injectées.

Lorsque la fibrine précipite, elle entraîne les particules de carbone avec elle et en cause la coalescence. A mesure qu'ils sont formés, les microcoagulums de fibrine contenant les particules de carbone sont arrêtés et collés sur la surface des capillaires pulmonaires principalement.

Ainsi, les résultats signalés plus haut donnent une explication rationnelle des phénomènes observés au cours de l'étude de la disparition de la circulation, chez le Rat, de l'encre de Chine lors de l'injection des doses croissantes d'encre.

L'épuration de plus en plus rapide du carbone du sang causée par des doses d'encre supérieures à 16 mg de carbone pour 100 g résulte du phénomène de microcoagulation de la fibrine et de la coalescence de particules de carbone avec les micro-caillots. Ceux-ci sont retenus dans le poumon et disparaissent ainsi de la circulation.

Les résultats présentés dans le tableau III montrent que chez la Souris, la dose de 48 mg de carbone pour 100 g ne cause pas de diminution sensible du taux des plaquettes du sang. Chez cette espèce animale, le phénomène de l'épuration accélérée du sang pour les doses croissantes de carbone n'a été observé qu'avec des doses de carbone plus élevées, et encore d'une façon très irrégulière et très atténuée.

TABLEAU III. — Effet de l'injection intraveineuse de la dose de 48 mg de carbone pour 100 g sur le nombre de plaquettes chez la Souris.

DOSE DE CARBONE INJECTÉE en mg pour 100 g	NOMBRE DE PLAQUETTES par millimètre cube	
	Avant l'injection d'encre	Après l'injection d'encre
48 . . . . .	585 000	580 000
	605 000	582 000
	726 000	643 000
	632 000	660 000
	419 000	453 000
	524 000	396 000
	419 000	453 000
	524 000	634 000

Il y a une relation constante entre la disparition rapide des particules de carbone du sang et la chute du taux des plaquettes sanguines.

Ces faits rendent compréhensible la différence de comportement de ces deux espèces animales à l'égard des doses élevées d'encre de Chine.

Comme on l'a rapporté dans le travail précédent [1], l'étude du sort du carbone dans les divers organes du Rat nous a permis de conclure que pour les doses de carbone supérieures, on trouve une accumulation importante de carbone dans les poumons. Il semble donc que la fixation pulmonaire soit conditionnée soit par la taille plus grande des particules agglutinées par la fibrine, soit par l'irritation causée par la coalescence des particules de carbone, provoquée par la fibrine, sur la surface de l'endothélium capillaire pulmonaire.

Ceci rappelle d'une manière frappante les faits observés par Wright [2] avec les cultures de pneumocoque injectées par voie veineuse chez le Lapin : chez les animaux normaux, il n'observe pas de phagocytose pulmonaire ni d'agrégation de bactéries, tandis que chez les animaux immunisés les germes agglutinés sont retenus dans les poumons et phagocytés soit par les granulocytes, soit par des cellules mononucléaires.

Cette étude confirme, en outre, les conclusions présentées dans le travail précédent [1] : pour l'exploration quantitative de la fonction granulopexique du foie et de la rate chez le Rat, il faut se limiter aux doses inférieures à 16 mg de carbone pour 100 g.

Nos résultats permettent d'éclaircir le mécanisme intime des faits observés par d'autres auteurs qui avaient déjà remarqué que la chute des plaquettes provoquée par l'injection intraveineuse de l'encre de Chine était un facteur important dans le déterminisme de la fixation de celle-ci par le poumon.

Nos résultats expérimentaux expliquent aussi les accidents hémorragiques spontanés observés par R. Midy [4] au niveau des lésions parasitaires intestinales de la Chauve-souris à laquelle on administre des doses importantes d'encre de Chine.

Cette étude définit également les limites dans lesquelles les particules de carbone de taille et de dispersion uniformes, selon la technique employée, peuvent influencer la microcoagulation *in vivo*. Elle constitue, enfin, un moyen d'étude des facteurs influençant la microcoagulation de la fibrine *in vivo* chez le Rat. En employant des doses de carbone qui, ou bien n'influencent pas la coagulation du sang *in vivo*, ou bien, au contraire, la provoquent, on peut, en effet, étudier au moyen de la cinétique de la disparition du carbone de la circulation et de son accumulation dans le poumon, les effets sur la coagulation de la fibrine *in vivo*

de certains facteurs qui l'influencent *in vitro*. Ceci fera l'objet d'une étude ultérieure.

#### CONCLUSIONS.

On a étudié chez le Rat et la Souris l'influence de l'injection intraveineuse de doses croissantes de carbone sur la teneur du sang en plaquettes et en fibrinogène. Chez le Rat, les doses de carbone allant jusqu'à 8 mg pour 100 g ne modifient aucun de ces facteurs. Avec la dose de 16 mg de carbone pour 100 g et avec des doses plus grandes, on note une chute aussi bien des plaquettes que du fibrinogène dont l'importance est proportionnelle à la dose de carbone injectée.

Chez la Souris on ne note pas, même avec des doses de carbone relativement élevées, de modification du taux des plaquettes sanguines.

Le fait que les mêmes doses de carbone ne produisent pas de modifications similaires de la coagulation sanguine *in vivo* chez le Rat et chez la Souris explique la différence de leur comportement quant à la cinétique de l'épuration sanguine et quant à la répartition du carbone dans les organes, lors de l'injection de doses croissantes de carbone.

Une hypothèse a été proposée rattachant à la microfloculation de la fibrine *in vivo*, l'effet paradoxal des doses croissantes de carbone chez le Rat, sur l'épuration sanguine et sur l'accumulation, si particulière, des granules de carbone dans les divers organes.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] B. N. HALPERN, G. BIOZZI, G. MENÈ et B. BENACERRAF. Ces *Annales* (sous presse).
- [2] H. D. WRIGHT. *J. Path. a. Bact.*, 1927, **30**, 185.
- [3] L. S. DUDGEON et H. K. GOADBY. *J. Hyg. Cambr.*, 1931, **31**, 247.
- [4] R. MIDY. Le conjonctif histiocyttaire (système réticulo-endothélial). *Thèse pharmacie*, Paris. Masson, 1939, p. 169.



# RECHERCHES COMPARATIVES SUR *ACTINOBACTERIUM CELLULITIS* ET *ACTINOBACTERIUM BAUDETI*

par A. R. PRÉVOT, C. MAZUREK et P. TARDIEUX (\*).

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

## INTRODUCTION.

Dans une série de travaux antérieurs, il a été démontré que les actinomycoses humaines reconnaissent au moins quatre agents étiologiques : *Actinobacterium israeli* [1], *Actinobacterium abscessus* [2], *Actinobacterium meyeri* [3] et *Actinobacterium cellulitis* [4 et 5].

Comme l'a montré Brygoo [6], la reproduction expérimentale de ces actinomycoses échoue avec les cultures pures, quelle que soit la voie d'introduction, quand on prend le cynocéphale comme animal d'expérience. Il y a donc un premier problème jusqu'ici irrésolu, c'est le mode d'action de ces anaérobies, si redoutables pour l'espèce humaine et si inoffensifs pour le singe.

En essayant de résoudre ce problème par l'extraction d'antigènes à partir de corps microbiens, la concentration des fractions et leur essai sur l'animal, nous avons mis en évidence une communauté antigénique entre le germe d'une actinomycose humaine *A. cellulitis* et le germe d'une actinomycose animale *A. baudeti*.

Avant de donner l'origine de nos souches, exposons d'abord l'historique assez compliqué du germe de l'actinomycose du chien et du chat.

En 1934, E. Baudet [7] décrit sous le nom d'*Actinomyces canis* un anaérobie facultatif poussant mieux en atmosphère de CO<sub>2</sub>, comme cause d'actinomycose du chien. Ce germe a été trouvé dans trois cas bien caractérisés par un pus à grains jaunes. Avec les cultures pures, il reproduit facilement la maladie chez le chien.

En 1939, puis en 1942, A. Brion [8] retrouve le même germe dans diverses formes d'actinomycose du chat et du chien, le redécrit bien et le figure parfaitement. C'est toujours un anaérobie

(\*) Société française de Microbiologie, séance du 10 mai 1951.

facultatif, poussant mal en aérobie et beaucoup mieux en atmosphère de  $\text{CO}_2$ . Toutefois la lecture des caractères cultureux nous incite à croire qu'il s'agit plutôt d'un anaérobie « de prédilection » microaérophile. A. Brion propose de le nommer *Actinomyces baudeti*, car le vocable proposé par Baudet, *A. canis*, a été employé en 1894 par Gasperini pour remplacer le terme de *Cladothrix canis* Rabé 1888 (l'identité de ces derniers n'ayant pas été prouvée).

ORIGINE DE NOS SOUCHES. — La souche 394 G d'*A. cellulitis* qui a servi à nos recherches est celle qui a été isolée par Lattès et ses collaborateurs et étudiée par Linhard [5] en 1949. Elle provient d'une cellulite jugale d'origine dentaire et d'allure actinomycosique observée chez un homme jeune, où elle fut isolée en même temps que *Staphylococcus anaerobius* et *Fusiformis fusiformis* associé à un Tréponème anaérobie. Elle n'est pas pathogène en culture pure.

La souche 565 d'*A. baudeti* que nous avons utilisée a été isolée par Goret et Joubert d'une ascite actinomycosique du chien. Nous les remercions vivement de nous avoir envoyé cette souche. Un travail d'ensemble sur les actinomycoses du chien et du chat sera publié séparément par ces auteurs.

Nous n'hésitons pas à nommer *A. baudeti* cette souche car ses caractères cultureux répondent exactement à ceux qui ont été décrits par A. Brion [8]. Toutefois, son degré d'anaérobiose est nettement plus marqué : aucune culture en présence de l'air ; arrêt de la culture en gélose profonde à 2 mm de la surface libre et maximum de croissance dans la zone critique ; il s'agit donc bien d'un anaérobie microaérophile.

COMPARAISON DES DEUX SOUCHES. — Du point de vue de la morphologie, nous ne constatons pas de différence sensible entre les deux souches. Elles répondent toutes deux à la définition du genre *Actinobacterium*.

Du point de vue de la physiologie et des caractères cultureux, voici les petites différences que nous avons observées :

1° Du point de vue des facteurs de croissance :

*A. cellulitis* est sérophile obligé ;

*A. baudeti* exige un extrait de cervelle.

2° Du point de vue fermentaire :

*A. cellulitis* fait fermenter glucose, lévulose, saccharose et amidon ;

*A. baudeti* ne fait fermenter que glucose, saccharose et amidon.

Le type fermentaire de *A. cellulitis* est acéto-formique-lactique.

Le type fermentaire de *A. baudeti* est propioni-formique-lactique.

Les nitrates sont réduits en nitrites par le premier en neuf jours en présence de lévulose, lactose, maltose, glycérine et amidon et par le second en trois jours en présence de tous les glucides étudiés.

Le premier ne donne pas d'indol ; le second en produit des traces en vingt-quatre heures.

Par contre, le premier donne des traces de scatol après huit jours, alors que le second n'en donne pas.

### 3° Du point de vue du pouvoir pathogène :

Tous les deux tuent le cobaye en dix à quinze jours sans reproduire l'actinomycose, et les filtrats tuent irrégulièrement les souris sans provoquer de lésion spécifique.

Il s'agit donc de deux microbes extrêmement voisins et il semble bien difficile de trouver des caractères cultureux suffisamment tranchés pour séparer les deux espèces : aussi avons-nous essayé de trouver des caractères différentiels dans l'étude biochimique des antigènes de ces anaérobies.

RECHERCHES IMMUNOCHIMIQUES. — Essayer de résoudre le problème de l'identité ou de la non-identité des espèces *A. baudeti* et *A. cellulitis* par la méthode courante de la séro-agglutination aboutit à une impossibilité matérielle, puisque les deux souches poussent en grumeaux très cohérents, difficiles à dissocier, auto-agglutinants, laissant le milieu absolument limpide.

Il s'agissait donc d'extraire un antigène des corps microbiens et de le soumettre aux précipitations croisées par les sérums anti-*baudeti* et anti-*cellulitis*.

MODE D'EXTRACTION. — Nous avons employé la technique de Julianelle et Wieghard [11] et celle de Webb [12], modifiées par B. Nisman (1). Toutes les manipulations sont effectuées en chambre froide (0°). On centrifuge 25 l de culture de douze à quinze jours de *A. cellulitis* en bouillon VF + sérum et 25 l de culture du même âge de *A. baudeti* en bouillon VF + extrait de cervelle. Les culots microbiens sont repris dans 150 cm<sup>3</sup> de NaOH 0,05 N et on laisse pendant vingt heures à 60°. On refroidit, puis on centrifuge quarante-cinq minutes.

Le surnageant est recueilli et traité par CCl<sub>3</sub> COOH 5 N pour amener le pH entre 3,5 et 4. On laisse trente minutes et on centrifuge pendant quinze minutes. Le surnageant est alors traité par 4 volumes d'éthanol, soit 600 cm<sup>3</sup>, pendant trente minutes. On centrifuge pendant trente minutes. Le culot est dissous dans 50 cm<sup>3</sup> d'eau distillée, additionnée de 5 cm<sup>3</sup> de CCl<sub>3</sub> COOH à

(1) B. NISMAN. Travaux inédits. Nous remercions vivement notre collaborateur B. Nisman d'avoir bien voulu nous enseigner sa technique.

50 p. 100. On laisse vingt minutes, puis on centrifuge trente minutes. Le surnageant est précipité par 5 volumes d'éthanol absolu ; on laisse huit à douze heures à 0°. On centrifuge trente minutes. Le précipité est lavé plusieurs fois à l'alcool, puis à l'éther et desséché dans le vide. On obtient une poudre blanche facile à conserver et à manipuler. Le rendement est de 60 mg pour 25 l de *A. cellulitis* et de 50 mg pour 25 l de *A. baudeti*.

DOSAGE DE N, P ET GLUCIDES. — Cette fraction a été soumise à une analyse sommaire en vue d'y doser N, P et les glucides (2).

Les chiffres donnés ci-dessous sont les moyennes de trois titrages.

	<i>A. cellulitis</i> p. 100	<i>A. baudeti</i> p. 100
N. . . . .	6,3	8,1
P. . . . .	0,2175	0,4516
Glucides après hydrolyse (exprimés en glucose) . . . . .	27,8	23,1

On voit, par ces dosages, que malgré des différences assez sensibles de chacun des trois constituants, il s'agit probablement de composés voisins.

PRÉPARATION DES SÉRUMS ANTI-MICROBIENS. — Etant donné la grosseur et la cohérence des grumeaux microbiens, il a fallu les homogénéiser par passage au broyeur-mélangeur pour obtenir des suspensions injectables. Ces suspensions étaient trente fois plus concentrées en microbes que les cultures : les culots de 3 l de cultures étaient repris par 100 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique et formolés à 1 p. 1 000. Chaque lapin reçut huit à dix injections intraveineuses à intervalles de deux jours et fut saigné cinq jours après la dernière injection (la mortalité fut très élevée au cours de cette immunisation).

RÉSULTATS. — A. Agglutinations homologue et hétérologue des corps microbiens homogénéisés.

	<i>A. cellulitis</i>	<i>A. baudeti</i>
Sérum anti- <i>cellulitis</i> . . . . .	totale à 1/640 partielle à 1/1 280	totale à 1/640 partielle à 1/1 280
Sérum anti- <i>baudeti</i> . . . . .	totale à 1/640 partielle à 1/1 280	totale à 1/640 partielle à 1/1 280

(2) L'azote a été dosé par la méthode de Kjeldahl ; le phosphore par la méthode de Fiske et Subbarow modifiée par Honeker et collaborateurs [10] ; les glucides après hydrolyse par la méthode de Hagedorn-Jensen.



On voit déjà, par ce tableau, qu'il existe une communauté antigénique très marquée, puisqu'il n'existe pas de différence entre les taux d'agglutinations homologues et hétérologues.

Il s'agissait ensuite de voir si la substance que nous avons extraite est l'antigène commun aux deux espèces.

B. Floculations homologue et hétérologue des extraits microbiens. (Suivant que les tubes ont été agités ou non, on observe une floculation ou une précipitation en anneau. Mais les taux sont les mêmes.)

	<i>A. cellulitis</i>	<i>A. baudeti</i>
Sérum anti- <i>cellulitis</i> . . . . .	1/20	1/20
Sérum anti- <i>baudeti</i> . . . . .	1/20	1/20

Ainsi l'extrait obtenu est bien antigénique, et cet antigène est commun aux deux microbes : pour obtenir la floculation ou la précipitation, il faut en utiliser 5 mg contenus dans 1 cm<sup>3</sup> et, quel que soit le sérum, le taux actif est le 1/20.

#### CONSÉQUENCES TAXONOMIQUES.

Bien que beaucoup moins fréquent que le couple *Spherophorus funduliformis-Spherophorus necrophorus* (dont l'un est l'agent des nécrobacillooses humaines et l'autre celui des nécrobacillooses animales, tous deux très voisins morphologiquement et physiologiquement et possédant un antigène commun), le couple *A. cellulitis-A. baudeti* pose un problème parallèle.

*A. cellulitis* est le germe d'une forme d'actinomycose humaine.

*A. baudeti* est celui d'une forme d'actinomycose animale (féline et canine).

Un premier point peut déjà être résolu : ils appartiennent au même genre. L'historique du genre *Actinobacterium*, sa priorité sur les autres synonymes ont été longuement exposés ailleurs [9] et nous n'y reviendrons plus. C'est donc au genre *Actinobacterium* qu'il faut rapporter les deux espèces.

Nous ne discuterons pas non plus les raisons qui ont amené A. Brion à substituer le vocable *baudeti* au vocable *canis*. La gravité du problème réside dans l'identité ou non des deux microbes. Les différences, si minimes soient-elles, existent : anaérobiose beaucoup plus marquée chez *A. cellulitis* et type fermentaire légèrement différent ; les similitudes sont multiples et la plus importante est la communauté d'un antigène. Nous ne pensons cependant pas avoir le droit de les identifier, et nous aurions plutôt tendance, en attendant de nouveaux faits, à considérer *A. cellulitis* comme une variété de *A. baudeti*.

## CONSÉQUENCES ÉPIDÉMIOLOGIQUES.

La fréquence des actinomycoses animales à *A. baudeti* (Baudet ; Brion ; Goret et Joubert) nous amène à penser que le réservoir de germes est le chien ou le chat ; la rareté des actinomycoses humaines à *A. cellulitis* (cas unique de Lattès, Prévot, Linhard, etc.) nous amène à penser que ces dernières seraient des contaminations de l'homme par les chats et les chiens. Nous nous proposons de continuer nos recherches pour donner des solutions à ces questions. En attendant une solution définitive, nous proposons d'appeler l'un *Actinobacterium baudeti* et l'autre *A. baudeti* var. *cellulitis*.

## CONCLUSIONS.

1° Une souche d'*A. cellulitis* provenant d'une actinomycose humaine a été comparée à une souche d'*A. baudeti* provenant d'une actinomycose du chat. A côté de nombreuses similitudes morphologiques et physiologiques, quelques différences ont été mises en évidence (facteur de croissance, type fermentaire).

2° Des sérums agglutinants ont été préparés contre chacune des deux souches. Leurs taux d'agglutination croisée, homologue et hétérologue, sont identiques.

3° De chacune des deux souches a été séparé un antigène somatique contenant azote, phosphore et un glucide. Cet antigène est précipité au même taux par le sérum homologue et le sérum hétérologue.

4° Les deux souches, très voisines, appartiennent au genre *Actinobacterium*. *A. cellulitis* apparaît, à la lumière de ces faits, comme une variété d'*A. baudeti*, variété dont l'anaérobiose est plus marquée et présentant un antigène commun avec l'espèce-type. L'actinomycose humaine à *A. cellulitis* pourrait reconnaître le chien et le chat comme réservoir de germes.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] A.-R. PRÉVOT. *Rev. Stomat.*, 1948, **49**, 1.
- [2] LACRONIGUE, PRÉVOT, BEAL et GOUDAERD. *Idem*, 1948, **49**, 421.
- [3] A.-R. PRÉVOT, G.-J. BEAL et P. TARDIEUX. *Ces Annales*, 1950, **79**, 763.
- [4] LATTES, GIRALDI, ROUSSEAU, PRÉVOT et LINHARD. *Soc. Stomat. France*, 1949.
- [5] J. LINHARD. *Ces Annales*, 1949, **76**, 478.
- [6] E.-R. BRYGOO. *Ces Annales*, 1950, **78**, 696.
- [7] E. BAUDET. *Ann. Parasit.*, 1934, **12**, 296.
- [8] A. BRION. *Rev. Méd. vét.*, 1939, **91**, 92 et 1942, **94**.
- [9] A.-R. PRÉVOT. *Ces Annales*, 1946, **72**, 2.
- [10] HONEKER, MA et HAAS. *J. Biol. Chem.*, 1940, **136**, 775.
- [11] JULIANELLE et C. W. WIEGHARD. *J. exp. Med.*, 1935, **62**, 23.
- [12] M. WEBB. *J. gen. Microbiol.*, 1948, **2**, 260.

## LA CELLULOLYSE BACTÉRIENNE. IMPORTANCE DES TECHNIQUES POUR SON ÉTUDE

par J. POCHON et M<sup>me</sup> BAÏ.

(Institut Pasteur. Service de Microbie technique,  
Laboratoire de Microbiologie du Sol.)

Il est extrêmement difficile, à la lecture des travaux récents, de se faire une idée claire du phénomène de la dégradation biologique de la cellulose dans la nature, qu'il s'agisse du sol ou du tube digestif, en particulier des Ruminants. Les notions classiques ont été bouleversées par la mise en œuvre de techniques nouvelles, surtout par l'utilisation de substrats cellulolytiques variés. De plus, l'étude des cellulases a fait récemment des progrès considérables et les bactériologistes n'ont pu encore en tenir compte dans la mise au point de leurs techniques.

On sait que classiquement la cellulolyse était attribuée, dans le sol, en aérobiose, à un petit nombre d'espèces spécialisées, *Cytophaga* et *Vibrio* ; en anaérobiose, à des bactéries sporulées. Elle était attribuée, dans le tube digestif, à des bactéries sporulées anaérobies. Dans tous les cas, le test de cellulose utilisé était la feuille de papier filtre.

La substitution au papier filtre de cellulose très finement broyée ou précipitée a, plus récemment, fait admettre le rôle, dans le sol, en aérobiose, d'un nombre important d'espèces appartenant aux genres *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Actinomyces* ; dans le sol et en anaérobiose, de bactéries sporulées et exceptionnellement de cocci ; dans le tube digestif, uniquement de cocci et de bactéries non sporulées, si l'on ajoute aux milieux de culture des quantités importantes de filtrat de contenu de panse.

Mais, par ailleurs, les notions précédentes doivent être révisées en raison des travaux de Reese et de ses collaborateurs qui ont montré que le système enzymatique, jusqu'à présent considéré comme simple, la cellulase classique, était complexe et comprenait deux enzymes ; un enzyme  $C_1$ , rompant les chaînes de la cellulose fibreuse : un enzyme  $C_x$  dégradant ultérieurement ces chaînons en glucose. Les germes porteurs de  $C_x$  seul, et ce sont les plus nombreux, ne peuvent hydrolyser que la cellulose précipitée, peu polymérisée, et non la cellulose fibreuse. Sur cette dernière, seuls

agissent les germes, beaucoup moins nombreux, équipés de  $C_1$  et de  $C_x$ . Ce sont les vrais cellulolytiques, les cellulolytiques complets et le test à la cellulose précipitée ne peut suffire à les identifier.

On voit donc que les techniques jouent un rôle considérable dans la mise en évidence de la cellulolyse bactérienne (J. Pochon [1, 2]) (1). Les résultats divergents apportés par les auteurs tiennent essentiellement à l'utilisation de techniques différentes. Aussi nous a-t-il semblé utile d'appliquer à la fois au sol et au tube digestif toute une série de techniques, les mêmes pour ces deux milieux et de comparer les résultats obtenus ; travail en quelque sorte écologique, sans chercher à déterminer les espèces de façon précise, autrement que par leur morphologie. Nous ne dépassons donc pas le stade systématique du genre, ce qui suffit pour le but que nous nous proposons.

#### TECHNIQUES.

La gamme des techniques utilisées est très étendue.

I. CELLULOLYSE EN AÉROBIOSE. — 1° Plaques de silico-gel imprégnées avec la solution saline standard de Winogradsky additionnée d'azote nitrique et recouvertes d'une feuille de papier filtre (Durieux III), puis ensemencées avec des grains de terre ou des particules de contenu de panse.

2° Plaques de silico-gel imprégnées de la même façon et recouvertes d'une suspension de cellulose précipitée. Celle-ci est elle-même préparée selon deux procédés :

a) 200 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique concentré sont additionnés de 120 cm<sup>3</sup> d'eau distillée. Le mélange, porté à 57°, est versé sur 10 g de coton. Contact dix secondes, puis on verse 1 l d'eau froide. On laisse déposer ; on lave la cellulose qui est ensuite mise à sécher et remise en suspension.

b) On étend à 300 cm<sup>3</sup>, avec de l'eau, 270 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique concentré. On ajoute du coton en quantité suffisante pour absorber complètement l'acide. Contact de vingt-quatre heures à froid. Laver. Sécher. Suspension aqueuse broyée pendant trente-six heures dans un agitateur avec billes de verre.

3° Papier enfoui dans la terre, soit avec la technique de la colonne de terre, soit papier enfoui directement dans un pot de terre, verticalement (le papier est plié en quatre épaisseurs, les prélèvements sont faits sur les plis intérieurs, gagnés par la cellulolyse). Dans les deux cas, l'attaque en aérobiose correspond à la partie supérieure, proche de la surface du papier. De la même façon nous avons enfoui du papier dans du contenu de panse.

(1) Une bibliographie sera trouvée à la fin de ces deux articles.



II. CELLULOLYSE EN ANAÉROBIOSE. — 1° Papier enfoui, comme il vient d'être dit. Les prélèvements sont faits à la partie inférieure du papier, loin de la surface, correspondant à la zone d'anaérobiose.

2° Milieu liquide de Hungate additionné de papier filtre.

3° Milieu de Hungate gélosé à la cellulose précipitée.

4° Milieu de Hungate gélosé avec feuille de papier filtre contre la paroi du tube.

5° Milieu K.S.G.A. de Sijpesteijn avec différentes concentrations de filtrat de panse et d'eau de levure.

Les cultures ont été faites à 23° pour le sol et à 37° pour la panse. On notait soigneusement les modifications (consistance, couleur) du papier, l'aspect des colonies et leur auréole claire sur milieu solide à la cellulose précipitée. Les prélèvements étaient effectués régulièrement et les examens microscopiques faits à l'état frais et après coloration par l'érythrosine phéniquée ou par la méthode de Gram, en lumière ordinaire et en lumière polarisée.

#### RÉSULTATS.

I. CELLULOLYSE DANS LE SOL EN ANAÉROBIOSE. — Deux échantillons de terre ont été examinés : une terre de jardin, un terreau riche en matière organique.

Sur *silico-gel au papier*, le terreau nous a donné presque uniquement des *Vibrio*, comme il fallait s'y attendre, assez variés d'ailleurs dans leur pouvoir chromogène (jaune ocre, jaune serin, vert...). Dans la terre de jardin il y avait quantités équivalentes de *Vibrio* (les mêmes, plus un *Vibrio* à pigment violet) et de *Cytophaga* (presque toujours des *Sporocytophaga*) et quelques colonies de champignons.

Ces résultats sont absolument classiques et correspondent à la description de Winogradsky. Avec cette technique ce sont les seuls germes mis en évidence.

Sur *silico-gel à la cellulose précipitée* ou finement broyée mécaniquement, nous n'avons tenu compte que des colonies s'entourant d'une zone de lyse de la cellulose. D'une manière générale, la pigmentation est beaucoup moins accentuée que sur papier et plus rare. Les images obtenues avec la terre de jardin et le terreau étaient semblables : quelques *Vibrio* et *Cytophaga*, des champignons assez nombreux, des bâtonnets se colorant et surtout ne se colorant pas par la méthode de Gram, des Corynebactéries, pas de cocci. (Une cause d'erreur est à éviter : sur ce milieu les *Sporocytophaga* prennent très rapidement leur forme microcyste qui pourrait être prise pour des cocci.)

La cellulose précipitée met donc en évidence des germes beaucoup plus variés. Le fait est classique également. Doit-on admettre

pour tous un véritable pouvoir cellulolytique ? Les recherches de Reese sur les cellulases ne semblent pas le permettre. La question sera traitée plus loin, au chapitre de discussion.

Sur *feuille de papier en colonne de terre ou enfouie dans le sol* on note, surtout avec le terreau et enfouissement en pot, une prédominance très nette des champignons avec quelques rares *Vibrio*. Les *Cytophaga* sont exceptionnels. Les autres types de bactéries sont absents. Ainsi, dans ces conditions — les plus proches des conditions naturelles — le rôle des bactéries paraît assez effacé par rapport à celui des champignons.

II. CELLULOLYSE DANS LE SOL EN ANAÉROBIOSE. — Sur *colonne de terre et papier enfoui en pot* on retrouve exceptionnellement, en profondeur, quelques *Cytophaga*, mais ce sont encore les champignons qui dominent, associés à des bactéries à Gram-positif ou négatif sporulées. Les bactéries sont plus nombreuses aux points attaqués par les champignons.

Nous retrouvons donc ici les bactéries mises en évidence par les méthodes d'ensemencement en milieu liquide avec feuille de papier filtre, à savoir les bactéries sporulées, mais ici encore, dans les conditions naturelles, les champignons semblent jouer un rôle capital.

En milieu K.S.G.A. avec *filtrat de panse* (25 p. 100), les fermentations du papier filtre, après ensemencement avec la terre de jardin ou le terreau, sont rapides (trois jours) et les passages se font facilement de tube à tube. Ce milieu présentait pour nos expériences un intérêt particulier, en ce sens qu'il permettait de voir si, en ajoutant des facteurs de croissance aux milieux habituellement utilisés pour le sol, analogues à ceux employés pour la panse, des espèces autres que les bactéries sporulées classiques du sol pourraient être mises en évidence, ce qui d'ailleurs, *a priori*, était peu vraisemblable ; de fait, il n'en a rien été et, dès le premier ensemencement, ce sont les bactéries sporulées qui, pratiquement seules, sont apparues comme responsables de la cellulolyse.

III. CELLULOLYSE DANS LA PANSE DE BŒUF. — *Examen direct.* — Il a été effectué une heure après le prélèvement aux abattoirs, sur plusieurs échantillons provenant de bêtes différentes.

On note très peu de bâtonnets sporulés ou non et une prédominance considérable des cocci groupés en énormes amas sur les débris de tissus végétaux.

En dehors des cocci irrégulièrement groupés, de taille et d'affinité tinctoriale diverses, au moins trois types ont pu être morphologiquement identifiés.

1° Cocci groupés en longues chaînes, volumineux (environ 3  $\mu$  de

diamètre), elliptiques, le grand axe du coccus étant perpendiculaire à l'axe de la chaîne (image en « pile d'assiettes »), très tassés les uns sur les autres, ne se colorant pas par la méthode de Gram (fig. 1). Ces germes sont assez rares et, le plus souvent, éloignés des débris de tissus en cellulolyse.

2° Cocci en chaînettes courtes, ovoïdes, le grand axe étant aligné sur celui de la chaîne, assez distants les uns des autres dans ces chaînes. Celles-ci sont presque toujours bifurquées en Y. Chaque élément mesure environ  $1\ \mu$  sur  $2\ \mu$ . Se colorent par la méthode de Gram (fig. 2). Eux aussi sont assez rares et à distance des éléments tissulaires en cellulolyse.

3° Cocci en amas extrêmement volumineux, formant des masses

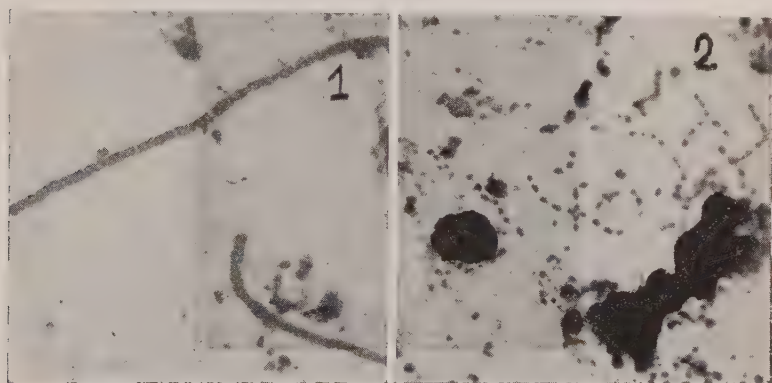


FIG. 1 et 2. — Cocci de la panse.

compactes sur les tissus végétaux ; de ces amas s'échappent des chaînes plus ou moins longues mais, le plus souvent, longues. C'est dans ces chaînes que la morphologie peut être définie : cocci très petits ( $1\ \mu$ ), réguliers, très rapprochés les uns des autres dans les chaînes qui ne sont jamais ramifiées et assez flexueuses. Ne se colorent pas par la méthode de Gram (fig. 3). Ce sont de beaucoup les plus nombreux et ceux qui paraissent surtout responsables de l'attaque des tissus végétaux.

Si on laisse le contenu de panse à la température du laboratoire (et mieux à  $37^\circ$ ) et si des examens sont faits régulièrement, on voit, à côté des cocci, dont le nombre n'augmente pas, se développer des bactéries sporulées en quantités importantes. Nous verrons plus loin l'interprétation de ce phénomène.

*Ensemencement sur silico-gel au papier.* — Sur ce milieu essentiellement aérobie, il n'y a pratiquement pas de culture, comme il fallait s'y attendre. Cependant un *Vibrio*, à développement très

lent, a pu être isolé. Il s'agit vraisemblablement d'un germe du sol ingéré avec l'alimentation et sans aucun rôle dans la panse. (Ce fait avait déjà été signalé par Arnaud.)

*Feuille de papier immergée dans le contenu de panse.* — La feuille de papier est attaquée, surtout à la partie supérieure et complètement détruite en cinq à six jours. On note une prédominance des bactéries sporulées avec cependant quelques amas de cocci en chaînettes.

Si la feuille de papier est immergée dans du liquide de panse (obtenu par centrifugation), désaéré et scellé sous vide, celle-ci est attaquée avec prédominance de cocci Gram-positif et négatif,

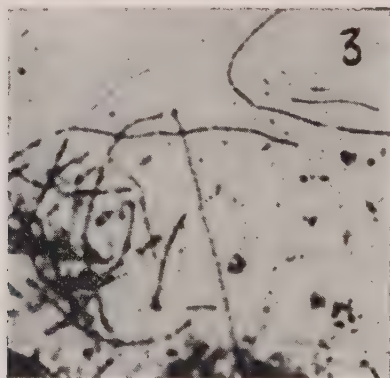


FIG. 3. — Cocci de la panse.

mais on ne retrouve pas les chaînettes observées dans le contenu total de la panse à l'examen direct.

*Milieu liquide K.S.G.A. au papier.* — Sans extrait de panse ni eau de levure ce milieu permet la prolifération de bactéries sporulées seules avec cellulolyse lente. Avec extrait de panse (50 p. 100) et eau de levure on note au premier ensemencement une cellulolyse rapide (vingt-quatre heures) avec quelques bactéries sporulées seulement et prédominance de cocci ; mais ici encore, les trois types en chaînettes décrits plus haut ont disparu. Au cours des passages successifs on voit apparaître les bactéries sporulées qui éliminent peu à peu les cocci.

*Milieu de Hungate à la cellulose précipitée.* — Les colonies isolées, qui au premier ensemencement sont rarement pures (elles proviennent vraisemblablement de débris de tissu végétal contenant plusieurs types de germes), sont surtout constituées de cocci (exceptionnellement en chaînes) et du même type que ceux trouvés dans les cultures citées plus haut. Ils sont presque constamment



associés à des bactéries sporulées et asporulées (dont il est difficile de dire s'il ne s'agit pas de formes végétatives des précédentes).

#### DISCUSSION ET CONCLUSION.

En ce qui concerne la cellulolyse dans le sol, un premier fait se dégage des résultats rapportés ci-dessus.

En aérobiose, si on utilise le papier filtre, c'est-à-dire la cellulose fibreuse aussi peu modifiée que possible, seuls sont mis en évidence les *Cytophaga* et les *Vibrio* ainsi que les champignons. Si la cellulose fibreuse est remplacée par de la cellulose précipitée (ou même finement broyée mécaniquement), d'autres germes apparaissent : bacilles, *Corynebactéries*, *Actinomycètes*. Mais, dans ce dernier cas, les germes possédant la seule cellulase  $C_x$  sont capables de proliférer. A moins d'introduire une nouvelle définition, ces germes ne peuvent être qualifiés de cellulolytiques, ou tout au moins de cellulolytiques complets. Ce qui ne veut d'ailleurs pas dire que leur rôle soit négligeable dans la nature, où ils peuvent attaquer directement les substances du type des hémicelluloses et aussi les corps intermédiaires formés par les cellulolytiques vrais, possédant la cellulase  $C_1$ , aux dépens des chaînes moléculaires de la cellulose fibreuse.

En ce qui concerne la cellulolyse dans le sol en anaérobiose, celle-ci apparaît toujours comme liée aux bactéries sporulées. L'addition au milieu de culture de facteurs de croissance (sous forme de filtrat stérile de contenu de panse) ne fait pas apparaître d'autres germes dans ces milieux. Par ailleurs, le rôle des champignons ne doit pas être négligé.

Dans le tube digestif, le problème est beaucoup plus complexe. Il est indiscutable que l'examen microscopique direct montre une immense majorité de cocci très divers et quelques très rares bactéries sporulées. Les cocci, en particulier, sont groupés en énormes amas autour des débris tissulaires. Mais si l'examen est fait en lumière polarisée, on constate que ces débris, qui n'ont d'ailleurs pas la morphologie fibreuse, sont dénués de biréfringence. Tout fragment qui présente une image de fibre garde sa biréfringence et apparaît intact (à part les ruptures mécaniques) et ne se trouve pas d'ailleurs enrobé dans les amas de cocci. Ces constatations permettent de douter que ceux-ci aient une action, tout au moins intense, sur la fibre de cellulose elle-même.

Si on laisse vieillir le contenu de panse, surtout à 37°, l'examen direct montre une transformation complète de la microflore : ce sont les bactéries sporulées qui dominent alors et la majorité des débris *fibreuse* perdent leur biréfringence, traduisant une attaque de la fibre elle-même.

Or, la majorité des recherches récentes sur la cellulolyse dans

la panse utilisent la cellulose précipitée ou finement broyée ; cependant Sijpesteijn donne des images de culture sur feuille de papier mais, dans ces dernières conditions, l'attaque est toujours discrète et le taux de cellulolyse faible. Il est alors permis de se demander si les nouvelles espèces décrites récemment par divers auteurs sont des cellulolytiques vrais, possédant à la fois  $C_1$  et  $C_x$ . Ici encore, comme pour le sol, ce ne serait pas leur dénier toute action dans le tube digestif, mais la restreindre peut-être à certains types de tissus végétaux de structure non fibreuse.

Ainsi, de plus en plus, il apparaît que le phénomène de la cellulolyse est extrêmement complexe et doit être interprété comme une série de réactions, de dégradations en chaîne de la fibre cellulosique ; de nombreux microorganismes y concourent, dont la part respective, pour chacun d'eux, est encore difficile à analyser et à préciser.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. POCHON. Ces *Annales*, 1949, **77**, 419.
- [2] J. POCHON, TCHAN et AUGIER. Ces *Annales*, 1950, **79**, 376.

**ACTION DE LA CORTISONE  
ET D'UN EXTRAIT CORTICO-SURRÉNAL  
SUR LE CHOC ANAPHYLACTIQUE PASSIF  
DU COBAYE (\*)**

par PIERRE GRABAR, B. BENACERRAF et G. BIOZZI.

(avec la collaboration technique de M. CHALEIL).

(*Institut Pasteur. Service de Chimie microbienne.*)

Les succès thérapeutiques de l'utilisation de la cortisone dans des cas où l'on admet souvent l'intervention de mécanismes allergiques ont fait penser à beaucoup d'auteurs que les hormones corticales devaient avoir une action dans la prévention de phénomènes anaphylactiques. De très nombreuses expériences, que nous ne pouvons résumer ici, ont été réalisées, souvent dans des conditions très différentes. Disons seulement qu'en utilisant des méthodes précises, plusieurs auteurs ont abouti à des résultats négatifs [2, 4]. Il faut cependant noter que les auteurs n'ont envisagé que deux possibilités d'une action de cette hormone : sur la formation des anticorps ou sur la réaction antigène-anticorps *in vivo*. Cependant, on doit envisager encore une autre possibilité, celle d'une libération d'anticorps intracellulaires sous l'effet hormonal. On admet généralement que des manifestations du type anaphylactique ou allergique sont dues justement à des anticorps intracellulaires. D'autre part, on sait que la cortisone ou des extraits cortico-surrénaux (E. C-S.) provoquent une transformation profonde de la formule leucocytaire. Enfin, dans un travail publié il y a un an, il a été montré que sous l'effet d'une injection d'un extrait cortico-surrénal il y avait, chez des rats immunisés, baisse du taux des lymphocytes et leur disparition de la couronne périfolliculaire de la rate, ainsi qu'une augmentation de la teneur en agglutinines du sérum [1]. Ce parallélisme pouvait faire penser à une relation de cause à effet, c'est-à-dire que, conformément à l'hypothèse de Dougherty et White, l'accroissement du taux en

(\*) Ce travail a fait l'objet d'une communication à la Société Française d'Allergie le 20 février 1951.

anticorps pourrait être dû à la lyse des lymphocytes qui les contiendraient.

Nous nous sommes donc demandé si, sous l'effet de la cortisone ou de l'E. C-S, il ne se produirait pas une libération des anticorps intracellulaires responsables des manifestations anaphylactiques. Dans une publication récente [6], l'un de nous a formulé une telle hypothèse pour tenter d'expliquer des constatations de Kerr, McGirr et Robertson sur la disparition passagère des réactions cutanées de vaches sensibilisées à *Trichomonas foetalis*, sous l'effet d'extraits corticaux et d'autres stimuli [8].

MÉTHODES ET MATÉRIEL. — Nous avons choisi comme méthode expérimentale le choc anaphylactique passif du cobaye, car depuis que Kabat, Landow et l'un de nous (B. Benacerraf) ont introduit des méthodes quantitatives dans ce domaine, on peut obtenir d'une manière parfaitement régulière des chocs en utilisant : des sérums de lapin dont la teneur en anticorps est connue, des solutions titrées d'antigène et des temps bien déterminés entre la sensibilisation et l'injection déchainante [7].

A l'exception de quelques cas, mentionnés spécialement, notre mode opératoire était le suivant : on injecte à des séries de cobayes (pesant  $230 \pm 20$  g), dans les veines de la patte, 1 ml d'une dilution de sérum de lapin anti-ovalbumine contenant 31 à 35  $\mu$ g d'N d'anticorps. L'injection, également intraveineuse, de 1 ml d'une solution d'ovalbumine pure à 1 mg/ml quarante-huit heures plus tard provoque régulièrement un choc très fort, presque toujours mortel.

L'injection des diverses préparations, que nous avons essayées pour obtenir un effet protecteur, se faisait six heures avant l'injection d'ovalbumine, dans un volume de 1 ml et par voie sous-cutanée.

Dans chaque expérience on a utilisé un lot de cobayes aussi homogène que possible ; ce lot a été séparé en deux ou plusieurs groupes, dont un servait de témoin. Ce groupe recevait les mêmes doses de sérum et d'antigène que les animaux traités par une injection d'hormone. Dans les premières séries d'expériences, cette dernière a été remplacée, chez les cobayes témoins, par une injection de 1 ml de solution physiologique. L'expérience a démontré que cette injection ne produit aucun effet ; c'est pourquoi, par la suite, elle a été supprimée.

Les sérums anti-ovalbumine provenaient de plusieurs lapins hyperimmunisés par la méthode employée couramment [5]. On a l'impression que des résultats plus réguliers sont obtenus avec des sérums plus riches en anticorps, bien que le taux en N des anticorps précipitables des dilutions utilisées soit le même. Il semblerait que la présence de quantités plus grandes de protéides inertes



dans les sérums pauvres en anticorps exerce une action inhibitrice. Les préparations hormonales utilisées ont été, d'une part, la « Cortone », suspension commerciale de cortisone de la Maison Merck (U.S.A.) et, d'autre part, des extraits aqueux de poudre de cortico-surrénale de la Maison Choay (1). Ces extraits (E. C-S) ont été préparés la veille de l'injection en mettant en suspension une quantité pesée de poudre sèche dans de la solution saline physiologique, en agitant cette suspension pendant une demi-heure et en séparant ensuite un important résidu insoluble par centrifugation. Ces extraits se présentent comme des liquides brunâtres, opalescents.

RÉSULTATS. — Deux expériences caractéristiques de l'effet produit par l'E. C-S sont résumées dans le tableau I. Dans l'expé-

TABLEAU I.

NUMÉRO de l'expérience	PRODUIT INJECTÉ	NOMBRE d'animaux	CHOCs				
			mort.	fort	moyen	léger	rien
N° 1. 29 juin 1950.	Sol. physiol. . . . .	6	4		1	1	
	E. C-S. (100 mg/ml).	4 (1)				2	2 (2)
	Sér.-alb. (30 mg/ml).	6	2 (3)		3	1	
N° 2. 5 juillet 1950.	Sol. physiol. . . . .	4	3		1		
	E. C-S. (50 mg/ml).	6				6	
	Sér.-alb. (30 mg/ml).	6	3		2	1	
(1) Trois autres cobayes succombent après l'injection de l'extrait. (2) L'examen de ces cobayes montre une hémorragie des surrénales. (3) Un de ces cobayes meurt plusieurs heures après le choc.							

rience n° 1, 1 ml d'extrait correspond à 100 mg de poudre sèche. Cette dose s'est avérée nocive, car 3 animaux sur 7 ont succombé à l'injection de l'extrait avant l'injection d'antigène. Ils avaient un œdème du poumon et une hémorragie des surrénales. Par la suite, nous avons utilisé des extraits de 50 mg/ml. Dans ces deux expériences, en plus des témoins habituels, d'autres témoins recevaient, à la place de l'hormone, et également six heures avant le choc, une injection de 1 ml de solution d'un protéide non spécifique, en l'occurrence : 30 mg de sérumalbumine de bœuf. De

(1) Nous tenons à remercier ici le Dr A. Gibson, directeur de la Division médicale de la Maison Merck (Rahway, U. S. A.), le professeur Querido de Leide et la Maison Choay d'avoir mis à notre disposition ces produits.

l'ensemble de ce groupe d'expériences nous croyons pouvoir conclure que l'E. C-S a un certain effet protecteur. Il faut ajouter deux observations supplémentaires : 1° sous l'effet de cet extrait, même lorsque la protection n'est pas efficace, les manifestations du choc sont plus tardives que chez les témoins ; 2° les cadavres des cobayes qui ont succombé deviennent rigides en quelques minutes.

Contrairement aux expériences précédentes, nos essais de protection par injection de cortisone ont été entièrement négatifs. Comme le montre le tableau II, cette hormone, même à des doses

TABLEAU II.

NUMÉRO de l'expérience	PRODUIT INJECTÉ	NOMBRE d'animaux	CHOC				
			mort.	fort	moyen	léger	rien
N° 3. 18 décembre 1950.	Rien . . . . .	10	5	2	2	1 (1)	
	2 mg cortisone . . . . .	10	6		2	2	
	5 mg cortisone . . . . .	10	4	1		4	1
	10 mg cortisone . . . . .	10	5	2		2	1
	2 mg cortisone (2). . . . .	6	2			3	1
N° 4. 18 novembre 1950.	Rien . . . . .	15	6	3	6		
	5 mg cortisone 24 h. avant et 2 mg 6 h. avant choc.	14	4	2	6	2	
N° 5. 15 février 1951.	Rien . . . . .	10	8	2			
	5 mg cortisone . . . . .	10	8	2			
	E. C-S. (50 mg/ml). . . . .	10	6			1	3

(1) Ce cobaye n'a pas reçu la dose totale d'antigène.  
(2) Injection intraveineuse deux heures avant le choc.

très fortes, injectée par voie sous-cutanée six heures ou par voie veineuse deux heures avant l'injection déchainante, n'a produit aucun effet (expériences n°s 3 et 4). Enfin, l'expérience n° 5 illustre la différence entre les deux préparations hormonales.

Ainsi, nous croyons pouvoir conclure que l'E. C-S contient une substance douée d'une certaine activité protectrice ou provoquant l'intervention d'un mécanisme protecteur. L'extrait employé contient certainement beaucoup de substances diverses. Nous croyons avoir démontré que la cortisone n'est pas en cause, de même qu'une éventuelle action de protéides non spécifiques (expériences n°s 1 et 2) ; on sait, d'autre part, que les extraits de ce genre contiennent de l'adrénaline et ses dérivés et l'examen des cobayes morts sous l'effet d'une forte dose d'extrait nous a fait

envisager une action adrénalique. Dans une publication récente, Dury [3] a signalé les modifications de la formule leucocytaire provoquées par l'adrénaline. Pour pouvoir comparer l'action de l'adrénaline à celle de l'E. C-S, nous avons fait des expériences dans des conditions identiques aux précédentes, mais en injectant aux cobayes des doses importantes d'adrénaline. Les résultats obtenus, résumés dans le tableau III, ne sont pas très nets.

TABLEAU III.

NUMÉRO de l'expérience	PRODUIT INJECTÉ	NOMBRE d'animaux	CHOCs				
			mort.	fort	moyen	léger	rien
N° 6. 19 juillet 1950.	Rien . . . . .	7	1	2	2	1	
	500 µg adrénaline.	7	1 (1)	3 (2)		2	1
	250 µg adrénaline.	9	4 (3)		2	3	

(1) Mort tardive.  
 (2) L'examen d'un de ces animaux montre une hyperhémie intestinale, le poumon n'est pas anaphylactique.  
 (3) Deux sont morts tardivement ; les deux autres ont présenté, à l'autopsie, des poumons anaphylactiques.

Dans cette série, les cobayes étaient plus grands ; de ce fait, la dose d'anticorps injectée était insuffisante, et les réactions étaient moins violentes. Les animaux ayant reçu l'adrénaline ont présenté des réactions plus tardives que les témoins et ces réactions ne rappelaient pas toujours celles du choc classique. Cependant les animaux morts au cours du choc ont montré, à l'autopsie, une image assez caractéristique.

Bien que le comportement des animaux traités par l'adrénaline différât sensiblement de celui des cobayes traités par l'E. C-S, nous ne croyons pas pouvoir exclure, dans ce dernier cas, une éventuelle action de l'adrénaline ou de ses dérivés et, surtout, de la noradrénaline, qui est plus stable. Nos extraits ont été conservés à la glacière, pendant vingt-quatre heures, sans précautions spéciales. On pourrait donc s'attendre à une désactivation de l'adrénaline, à moins que ces extraits ne contiennent quelque substance protectrice. Nous espérons pouvoir préciser cette question dans de nouvelles expériences.

En ce qui concerne l'absence d'action de la cortisone, nos expériences confirment les observations faites dans d'autres conditions par différents auteurs. Or, puisque cette hormone provoque des remaniements profonds de la formule leucocytaire, de même que nos E. C-S et l'adrénaline, il semble qu'on ne puisse pas relier

directement l'effet protecteur de l'E. C-S à ce remaniement. La question du mécanisme de cet effet reste donc ouverte.

CONCLUSIONS. — L'utilisation d'une méthode quantitative de sensibilisation passive du cobaye (sérum anti-ovalbumine de lapin), a permis de constater que l'injection préalable (six heures avant le choc) de cortisone, même à des doses très fortes, ne protège pas contre le choc, tandis qu'un extrait aqueux de poudre de cortico-surrénale protège une partie des animaux. L'effet est plus manifeste que celui d'une injection de protéides non spécifiques et diffère de celui obtenu dans les mêmes délais après l'injection d'adrénaline. Le mécanisme de cet effet et la substance active restent à préciser.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. ASCHKENASY, A. BUSSARD, P. CORVAZIER et P. GRABAR. *Rev. Hématol.*, 1950, **5**, 107-147.
- [2] M. BJORDEBOE, E. E. FISCHER et H. C. STOECK. *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 37-48.
- [3] A. DURY. *Am. J. Physiol.*, 1950, **160**, 75-82.
- [4] E. E. FISCHER. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 1950, **26**, 255-260. Cette revue comporte des références bibliographiques des travaux antérieurs.
- [5] P. GRABAR, in Loiseleur. *Techniques de laboratoire*, 626. Masson édit., Paris, 1947.
- [6] P. GRABAR. *Ces Annales*, 1950, **79**, 640-654.
- [7] E. A. KABAT et H. LANDOW. *J. Immunol.*, 1942, **44**, 69-74. — B. BENACERRAF et E. A. KABAT. *Ibid.*, 1949, **62**, 517-522.
- [8] W. R. KERR, J. L. MCGIRR et M. ROBERTSON. *J. Comp. Pathol. Therap.*, 1949, **59**, 133-154.



# EFFET DU PLASMA PRELEVE CHEZ DES COBAYES TRAITÉS PAR LA CORTISONE SUR DES CULTURES *IN VITRO* DE FIBROBLASTES ET DE MACROPHAGES

par MARY BARBER et A. DELAUNAY (\*).

De nombreux auteurs ont déjà attiré l'attention sur l'effet anti-inflammatoire exercé *in vivo* par la cortisone. Ainsi Ragan et ses collaborateurs, frappés par le caractère trainant qu'offre la guérison des blessures chez les malades traités par la cortisone ou par l'ACTH [1], ont étudié l'action de fortes doses de cortisone sur des lapins atteints de plaies cutanées [2] ou de fractures [3]. Ils ont remarqué, à cette occasion, que l'hormone retardait très nettement l'évolution du granulome inflammatoire, ainsi que le développement du cal osseux. Taubenhau et Amromin [4] ont signalé par ailleurs que, chez le rat, au niveau d'abcès provoqués par l'essence de térébenthine, la cortisone était capable de gêner la multiplication des fibroblastes et la formation du collagène, cependant qu'elle activait la production des macrophages. Plus récemment, Coste, Basset et Delaunay [5] ont noté que, chez des rats également porteurs d'abcès dus à l'essence de térébenthine, l'importance du tissu de granulation était diminuée par de fortes doses de cortisone, augmentée au contraire par des doses analogues de désoxycorticostérone. Toutes les observations précédentes étaient faites chez des animaux soumis à une série d'injections de cortisone. Mais Baker [6] a montré que le simple dépôt local de l'hormone sur des blessures conduisait également à un retard de la cicatrisation (1).

Dans ces différents cas, le mode d'action de la cortisone reste obscur. Les recherches ici présentées ont été faites dans le dessein de savoir si les plasmas d'animaux traités par la cortisone exercent une action directe sur la croissance *in vitro* de ces deux grands types de cellules inflammatoires que sont les fibroblastes et les macrophages. La sensibilité chimiotactique des polynucléaires

(\*) Société française de Microbiologie, séance du 10 mai 1951.

(1) Un exposé d'ensemble consacré à l'action anti-inflammatoire de la cortisone a été publié par l'un de nous dans la *Semaine des Hôpitaux*, 1951.

déposés dans les mêmes plasmas a, de même, été étudiée à plusieurs reprises.

#### TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE.

**CULTURES DE TISSUS.** — Pour les cultures de fibroblastes, nous avons utilisé de petits fragments de cœur embryonnaire de poulet ; les cultures de macrophages ont été préparées à partir de la rate de cobayes adultes. Toutes nos expériences ont été faites, non pas avec des souches qui avaient déjà subi un certain développement dans un milieu normal, mais avec des *cultures au départ*. Les fragments de tissus étaient déposés dans un milieu constitué en parties égales par de l'extrait de rate (de cobaye) et du plasma (ââ : 1 goutte). La rate avait été broyée dans 4 à 5 cm<sup>3</sup> d'une solution de Ringer. Pour l'obtention du plasma, nous avons régulièrement opéré ainsi : 4 cm<sup>3</sup> de sang, prélevés chez le cobaye par ponction cardiaque étaient mélangés avec 4 cm<sup>3</sup> d'une solution de Ringer renfermant de l'héparine dans la proportion de 1 p. 10 000, puis centrifugés immédiatement. Les cultures étaient placées dans des boîtes de Petri, à raison de 8 cultures par boîte, le couvercle étant ultérieurement scellé par un mélange de vaseline et de paraffine. En chaque cas, l'effet des plasmas étudiés a été observé sur un total de 16 cultures, le matériel témoin étant constitué par des cultures faites en plasma normal.

**CHIMIOTACTISME LEUCOCYTAIRE.** — Nous nous sommes servis ici de polynucléaires obtenus par ponction d'un exsudat péritonéal de cobaye, l'inflammation de la séreuse ayant été provoquée, quelques heures plus tôt, par une injection de bouillon peptoné stérile. Les globules, après centrifugation, étaient remis en suspension soit dans des plasmas de cobayes normaux, soit dans les plasmas fournis par des cobayes traités par la cortisone. Leur sensibilité chimiotactique a été déterminée avec l'aide de la méthode de Comandon [7]. Quelques gouttes de la suspension leucocytaire étaient déposées sur une lame de verre à la surface de laquelle avaient, au préalable, été fixés par dessiccation des grains d'amidon de pomme de terre. Les gouttes étaient recouvertes d'une lamelle et celle-ci était lutée afin d'éviter toute dessiccation. Aussitôt après, les préparations étaient déposées à 37° C pendant trente minutes ou une heure, puis elles étaient examinées au microscope. Dans les conditions normales on observe alors, autour des grains d'amidon, la présence de nombreux polynucléaires étalés et fixés sous forme de croissants (chimiotactisme positif).

**CORTISONE ET DÉSXYCORTICOSTÉRONNE.** — Les préparations utilisées comprenaient :

- a) une suspension d'acétate de cortisone Merck renfermant 25 mg par millilitre et
- b) une solution huileuse de DOCA (syncortyl) renfermant 10 mg par millilitre.

ADDITION DIRECTE DES PRODUITS AUX CULTURES DE TISSUS. — I goutte de la solution huileuse de DOCA ou I goutte plus ou moins diluée de la suspension de cortisone (dilutions en Ringer) ont été ajoutées à différentes cultures en expérience.

PLASMA NORMAL TRAITÉ PAR LA CORTISONE *in vitro*. — Un échantillon de cortisone était centrifugé. Le culot était lavé deux fois avec de l'eau physiologique, puis remis en suspension dans du plasma ajouté en quantité égale au volume de liquide initial. Cette préparation était ensuite déposée à 37° et maintenue à cette température pendant des délais variables, allant de deux heures à quarante-huit heures. A ce moment, une nouvelle centrifugation était faite, qui nous permettait d'obtenir un plasma clair, sans cristaux. Dans plusieurs expériences, celui-ci nous a servi pour la mise en cultures des tissus.

TRAITEMENT DES COBAYES. — Nous avons eu recours à trois voies d'injection :

a) *Sous-cutanée*. — En ce cas, les cobayes ont reçu pendant trois jours une injection quotidienne de cortisone ou de DOCA (à raison de 1 mg pour 30 g de poids d'animal). Ils étaient saignés le quatrième jour.

b) *Intrapéritonéale*. — Dose unique (25 ou 50 mg) de cortisone ou de DOCA. Animal saigné une, deux, trois ou quatre heures plus tard.

c) *Intraveineuse*. — Le sang a été prélevé ici de une minute à quatre heures après l'injection de 25 mg de cortisone par voie intracardiaque.

*Endotoxine typhique*. — Celle-ci avait été préparée à partir de *S. typhi*, par la méthode classique de Boivin et Mesrobianu à l'acide trichloracétique. La solution aqueuse contenait environ 2 mg d'endotoxine par centimètre cube. 1 mg, injecté par voie intrapéritonéale, suffit pour tuer le cobaye en cinq heures environ.

## RÉSULTATS.

I. CORTISONE. — *Addition directe de la cortisone aux cultures*. — L'addition directe de I goutte de suspension renfermant 2,5 mg de cortisone (ou davantage) par millilitre a presque toujours *inhibé complètement la croissance des fibroblastes*. Lors de la mise en cultures, les fragments de tissus étaient entourés par des

cristaux d'hormone. Après vingt-quatre heures à 37°, cependant, les cristaux, d'abord placés au voisinage des fragments, avaient pour la plupart disparu. Seuls subsistaient ceux qui se trouvaient à la périphérie de la goutte de plasma coagulé.

Le liquide surnageant obtenu par centrifugation de notre préparation commerciale de cortisone inhibait, lui aussi, la croissance des fibroblastes. Nous avons donc senti le besoin de recommencer nos expériences en ajoutant aux cultures des cristaux de cortisone mis en suspension simplement dans l'eau physiologique. Les nouveaux résultats ont été comparables aux précédents.

Des expériences faites avec des polynucléaires de cobaye nous ont appris, par ailleurs, que l'excipient ici en cause n'avait plus de pouvoir cytotoxique à des dilutions égales ou supérieures au 1/10.

*Plasmas normaux traités par la cortisone « in vitro ».* — Six plasmas furent ainsi traités. L'un d'eux fut maintenu en présence de la cortisone à 37° pendant deux heures ; pour 4 plasmas, le temps de contact fut de dix-huit à vingt-quatre heures et, pour le dernier, de quarante-huit heures. Tous ces plasmas ont été ensuite centrifugés. Au fond des tubes, les cristaux se sont réunis en une masse de consistance caoutchouteuse et, même par agitation violente, il s'avéra impossible de les remettre en suspension. Pour la préparation conservée à l'étuve pendant quarante-huit heures, la gomme obtenue de la sorte montrait des signes évidents de digestion : elle était percée de petits trous. Nous n'avons jamais observé de semblables modifications en maintenant la cortisone, pendant des délais comparables, en présence de *sérum* normal. En ce cas, les cristaux ne montrent aucune tendance à s'agglutiner. Ils se déposent peu à peu au fond des tubes, mais une agitation, même légère, les remet sans peine en suspension.

Les liquides surnageants obtenus par centrifugation des mélanges plasma + cortisone et qui étaient toujours parfaitement clairs ont été utilisés comme plasmas pour la mise en culture de fibroblastes et de macrophages. Les 6 plasmas en expérience ont tous provoqué une *inhibition complète des cultures*. La dilution des milieux avec 1 goutte de la solution de Ringer n'a pas empêché cette inhibition. En revanche, celle-ci a été totalement ou partiellement supprimée par l'addition de 1 goutte de plasma normal. En présence de celui-ci, la croissance des cultures de macrophages a été sensiblement identique à celle des cultures témoins. Le résultat fut moins bon avec les fibroblastes : la croissance, ici, fut nettement retardée et, le plus souvent, les cellules néoformées ne tardèrent pas à montrer des signes de dégénérescence.



Nous avons recherché l'effet de 3 plasmas traités par la cortisone, obtenus respectivement après deux, dix-huit et quarante-huit heures de contact, sur la sensibilité chimiotactique des leucocytes. L'effet du premier a été nul. En revanche, les deux autres ont empêché complètement la migration des globules blancs vers les grains d'amidon. Mais il ne s'agissait pas là d'un banal effet cytotoxique car les cellules, reprises par du plasma normal, ont recouvré intact leur pouvoir chimiotactique.

*Plasmas d'animaux traités par la cortisone.* — Les doses de cortisone injectées étaient considérables : aussi l'état général des animaux était-il souvent précaire au moment de la saignée. Plusieurs cobayes même succombèrent avant la prise de sang. Par ailleurs, les plasmas recueillis ne furent pas toujours satisfaisants. L'hypercoagulabilité du sang pendant un traitement par ACTH ou cortisone a été notée par Cosgriff et ses collaborateurs [8]. Pour notre part, nous avons observé les faits suivants. Les plasmas provenant de nos cobayes ont tantôt coagulé spontanément avant la mise en culture, tantôt, après addition de l'extrait de rate *in vitro*, ils n'ont fourni qu'un coagulum fragile. Ajoutons encore qu'à plusieurs reprises, nous avons remarqué que les plasmas prélevés chez des animaux très malades renfermaient des microorganismes. Il y avait donc eu septicémie ou du moins bactériémie : ceci est sans doute à rapprocher des observations de Antopol [9] et de D'Arcy Hart et Rees [10] qui ont signalé l'existence d'infections hépatiques chez des animaux traités par la cortisone. En dépit des difficultés ainsi rencontrées, nous avons continué à injecter de fortes doses de cortisone, car ce sont les plasmas obtenus chez des cobayes très malades qui ont manifesté l'effet le plus net, *in vitro*, sur les cultures de fibroblastes et de macrophages.

1° *Plasmas obtenus après injections sous-cutanées.* — Pour ces expériences, une injection quotidienne était faite pendant trois jours et l'animal était saigné le lendemain de la dernière injection. Dans un premier temps, nous avons choisi, pour dose quotidienne, 25 mg, mais le plasma des rares animaux qui avaient supporté ce traitement renfermait des bactéries. Pour cette raison, nous avons eu recours, par la suite, à une dose beaucoup plus faible : 1 mg de cortisone pour 30 g de poids d'animal. Des 13 cobayes ainsi traités, 3 moururent avant la saignée ; 10 plasmas seulement purent donc être recueillis. Deux d'entre eux, qui étaient contaminés, furent éliminés. Les 8 autres servirent à la mise en culture de fibroblastes et de macrophages. Quatre exercèrent un effet très faible ou nul sur la croissance normale des cellules. Les 4 derniers provoquèrent une action inhibitrice plus marquée. Dans un cas, la multiplication des fibroblastes et aussi bien celle des macrophages furent presque

complètement suspendues. Le plasma en cause, cependant, ne troublait pas la sensibilité chimiotactique des polynucléaires. Le second plasma produisit une action toxique du même ordre, plus irrégulière cependant, aussi bien sur les fibroblastes que sur les macrophages : pour un certain nombre de cultures il n'y eut aucune croissance ; parfois, il y eut croissance légère, mais les cellules subirent rapidement un processus dégénératif. Les deux derniers plasmas, enfin, ne troublèrent en aucune façon les cultures de rate, mais ils provoquèrent une inhibition variable, le plus souvent marquée, de la croissance des fibroblastes.

2° *Plasmas obtenus après injections intrapéritonéales.* — Quatre animaux reçurent par voie intrapéritonéale une seule injection de 50 mg de cortisone, deux autres, dans des conditions identiques, une injection de 25 mg. Tous furent saignés de deux à quatre heures plus tard.

Ces injections ne déterminèrent aucun effet toxique, mais c'est peut-être uniquement parce que l'hormone n'était pas bien résorbée : de fait, chez certains cobayes sacrifiés plus tard, dans un cas vingt-quatre heures après l'injection, nous avons découvert encore dans la cavité péritonéale et sur la surface de l'intestin de gros amas de cristaux.

Des 6 plasmas recueillis comme nous l'avons dit et qui tous étaient stériles, 2 manifestèrent de l'hypercoagulabilité. Utilisés pour la mise en route de cultures de tissus, ils ont donné les résultats suivants : 2 ne gênèrent en rien la multiplication des macrophages et des fibroblastes (les cultures alors obtenues étaient comparables aux témoins). Le troisième plasma limita son action à retarder quelque peu la croissance des fibroblastes. Les 3 derniers, enfin, exercèrent une action inhibitrice variable sur les cultures de fibroblastes et aussi de macrophages. Pour ces expériences, il nous a été impossible d'établir un rapport entre l'importance de l'action inhibitrice observée, la dose de cortisone injectée et le moment de la saignée. Un animal, dont le plasma, qui avait été recueilli trois heures trente après une injection de 50 mg de cortisone, inhibait la croissance des fibroblastes et des macrophages, fut saigné à nouveau vingt-quatre heures après l'injection. Les cultures de fibroblastes et de macrophages préparées avec ce second plasma furent aussi belles — sinon plus belles — que les cultures témoins faites en plasma normal.

3° *Plasmas obtenus après injections intraveineuses.* — Dix cobayes reçurent par voie intracardiaque une injection de 25 mg de cortisone et un autre cobaye une semblable injection de 12,5 mg. Cinq animaux moururent aussitôt après l'injection sans qu'il ait été possible de prélever leur sang. Quatre furent saignés dans les cinq minutes qui suivirent l'injection ; ils succombèrent d'ailleurs aussitôt après cette intervention. Un animal, bien que

très fatigué, survécut trois heures ; peu avant sa mort, il fut saigné au cœur. Le dernier animal, enfin, fut saigné une heure trente après l'injection. Cette fois encore, la prise de sang eut un effet mortel.

Des 4 plasmas obtenus aussitôt après l'injection, 2 n'exercèrent apparemment aucun effet toxique sur les cultures de fibroblastes et de macrophages. Le troisième supprima presque complètement la croissance des fibroblastes, mais il n'eut aucun effet sur les cultures de rate. Le quatrième exerça des actions inhibitrices variables aussi bien sur les cultures de macrophages que sur celles de fibroblastes.

Le plasma obtenu une heure trente après l'injection empêcha complètement la croissance des fibroblastes, mais ne parut pas gêner la multiplication des macrophages. Le plasma prélevé trois heures après l'injection inhiba complètement la croissance *in vitro* des fibroblastes et des macrophages (voir figures). Il fut aussi en mesure de supprimer la sensibilité chimiotactique des polynucléaires, sans cependant tuer les cellules puisque celles-ci, reprises par du sérum normal, se dirigèrent à nouveau parfaitement vers les grains d'amidon.

*Addition de plasma normal.* — Le dernier plasma, dont il vient d'être question et qui avait été prélevé chez le cobaye trois heures après l'injection intracardiaque de cortisone, inhibait à la fois la croissance des fibroblastes et des macrophages même quand 1 goutte de plasma normal était ajoutée aux cultures. 1 goutte de plasma normal ajoutée au plasma obtenu une heure trente après l'injection permettait une croissance légère des fibroblastes, mais les cellules néoformées dégénéraient rapidement.

*Injection intraveineuse de l'excipient.* — 1 ml du liquide sur-nageant obtenu par centrifugation de la cortisone commerciale Merck fut injecté par voie intracardiaque chez 4 cobayes. Deux animaux furent saignés aussitôt après l'injection et deux autres trente minutes ou deux heures plus tard. Les injections ne provoquèrent aucun phénomène toxique immédiat.

Des 4 plasmas recueillis, le premier coagula partiellement malgré la présence d'héparine. En présence de jus de rate et des fragments de tissus, il donna, *in vitro*, un coagulum très imparfait. La croissance des cultures de fibroblastes obtenues dans ces conditions fut nettement retardée ; la croissance des macrophages, cependant, fut normale. En présence des 3 autres plasmas, les cultures de fibroblastes et de macrophages furent sensiblement comparables aux autres cultures témoins.

II. DÉSXYCORTICOSTÉRONÉ. — *Addition directe de DOCA aux cultures.* — Dans une série d'expériences, nous avons ajouté 1 goutte de la solution huileuse de DOCA contenant 10 mg/ml

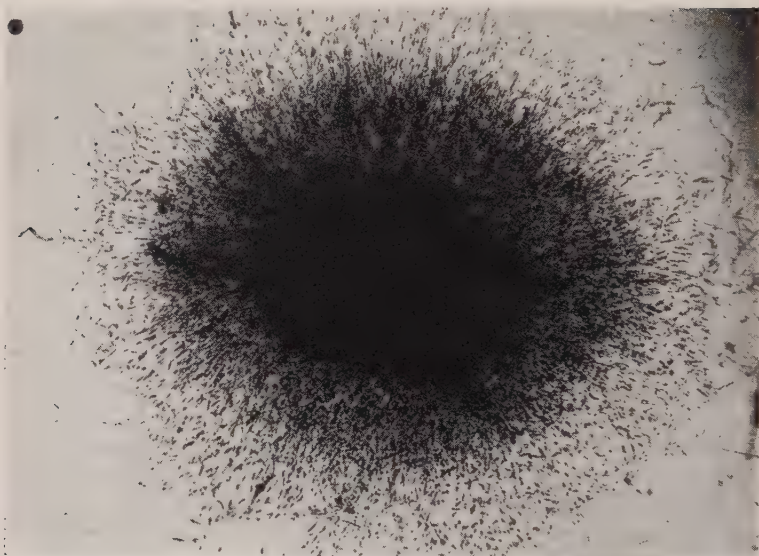


FIG. 1. — Culture *in vitro* de cœur embryonnaire de poulet. Milieu plasmatique normal. Remarquer la belle croissance des fibroblastes, obtenue en quarante huit heures. (Photomicrographie P. Manigault.)



FIG. 2. — Culture *in vitro* de cœur embryonnaire de poulet. Milieu plasmatique fourni par un cobaye traité par la cortisone. Remarquer, par comparaison avec la figure 1 (préparation témoin), l'absence totale de pousse cellulaire. (Photomicrographie P. Manigault.)





FIG. 3 — Culture *in vitro* d'un fragment de rate de cobaye adulte. Milieu plasmatique normal. Remarquer l'importante couronne de cellules migratrices autour du fragment, formée en quarante-huit heures. (Photomicrographie P. Manigault.)



FIG. 4. — Culture *in vitro* d'un fragment de rate de cobaye adulte. Milieu plasmatique fourni par un cobaye traité par la cortisone. Remarquer, par comparaison avec la figure 3 (préparation témoin), la lyse cellulaire autour du fragment. (Photomicrographie P. Manigault.)

à des cultures de fibroblastes en milieu normal. La croissance cellulaire fut complètement supprimée. Mais en raison de l'incapacité où nous nous trouvions de séparer, dans l'effet obtenu, ce qui revenait en propre à la DOCA ou au simple excipient huileux, nous n'avons pas poursuivi plus loin nos recherches en ce domaine.

**PLASMAS D'ANIMAUX TRAITÉS PAR LA DOCA.** — Les doses que nous avons utilisées étaient extrêmement toxiques pour les animaux. Pourtant, si le cobaye résistait aux injections, un plasma très satisfaisant était, dans la règle, obtenu.

1° *Plasmas obtenus après injections sous-cutanées.* — Quatre cobayes ont reçu une dose quotidienne de 1 mg de DOCA pour 30 g de poids d'animal pendant trois jours. Deux de ces animaux moururent en cours d'expériences. Les deux autres furent saignés le quatrième jour, alors que leur état général était déjà très déficient. Les deux plasmas recueillis servirent simplement à la mise en culture de fibroblastes. Dans un cas, les cultures obtenues furent sensiblement normales. Dans l'autre cas, la croissance fut légèrement retardée et les cellules dégénérèrent rapidement.

2° *Plasmas obtenus après injections intrapéritonéales.* — Trois animaux reçurent une injection de 50 mg et deux autres une injection de 25 mg de DOCA par voie intrapéritonéale. Tous les animaux furent saignés de une à quatre heures plus tard. Apparemment, le produit injecté avait été rapidement absorbé car tous les cobayes étaient très malades une à trois heures après l'injection. Néanmoins, ils devaient survivre.

Des deux plasmas prélevés trois et quatre heures après l'injection de la petite dose, le premier ne parut avoir aucune action toxique sur le développement des cultures, le second sembla stimuler à la fois la croissance des fibroblastes et des macrophages. Dans 2 cas seulement nous parvîmes à recueillir le plasma chez les animaux traités par la forte dose de DOCA. Un de ces plasmas, obtenu une heure après l'injection, inhiba complètement la croissance des fibroblastes et des macrophages. L'autre, obtenu trois heures après l'injection, n'eut aucun effet sur les cultures de fibroblastes ; il ne fut pas utilisé pour la mise en culture de fragments de rate.

**PLASMAS D'ANIMAUX TRAITÉS PAR L'ENDOTOXINE TYPHIQUE.** — Etant donné que, parmi les plasmas mis en œuvre, seuls montraient une action inhibitrice importante ceux qui avaient été fournis par des animaux très malades ou même moribonds, nous avons pensé qu'il serait intéressant d'étudier l'action sur des cultures *in vitro* de plasmas d'animaux également mourants, mais pour une autre

cause. Nous avons donc injecté chez 4 nouveaux cobayes, par voie intrapéritonéale, 1 ml d'endotoxine typhique. Ces animaux furent saignés deux ou trois heures plus tard, alors que leur état général était devenu extrêmement précaire. Les 4 plasmas servirent à la mise en route de cultures de fibroblastes et de macrophages. En tout cas, *la croissance observée fut normale.*

ETUDE COMPARATIVE DES RÉSULTATS FOURNIS PAR LA CORTISONE ET PAR LA DOCA. — Sur les plasmas fournis par les 20 animaux que nous avons traités avec la cortisone, 11 ont exercé une influence inhibitrice très nette sur la croissance des cultures de tissus *in vitro*. Dans 7 cas, l'action nocive s'est fait sentir à la fois sur les fibroblastes et les macrophages ; dans 4 cas, seule la croissance des fibroblastes fut suspendue, celle des macrophages évoluant au contraire normalement. En cas de croissance partielle, les cellules étaient en majorité atypiques et montraient dans la règle des signes précoces de dégénérescence.

Six plasmas seulement ont été étudiés, qui avaient été obtenus à partir de cobayes traités par la DOCA. De ces 6 plasmas, 4 ne manifestèrent aucun effet cytotoxique (ils se sont comportés, en d'autres termes, comme des plasmas normaux). Le cinquième a complètement empêché la croissance des fibroblastes et aussi des macrophages. Le dernier a plutôt stimulé le développement de ces deux types de cellules.

#### DISCUSSION.

Les résultats que nous venons d'exposer montrent clairement que les plasmas de cobayes traités par de fortes doses de cortisone sont en mesure d'inhiber le plus souvent la croissance des fibroblastes cultivés *in vitro* et parfois aussi celle des macrophages. Nous n'avons pas cherché à déterminer la quantité d'hormone présente dans nos plasmas, mais on peut penser que la rapidité avec laquelle la cortisone a diffusé dans l'organisme a varié largement d'animal à animal, et c'est probablement pour cette raison que quelques-uns de nos résultats ont été aberrants. Le traitement du plasma *in vitro* par la cortisone a donné des effets beaucoup plus constants. Des 6 plasmas traités, tous ont complètement inhibé la croissance des fibroblastes et aussi bien celle des macrophages.

Les recherches tendant à mettre en évidence une action directe de la cortisone sur des cultures de tissus *in vitro* ont été jusqu'à présent très rares. Heilman [41], ayant étudié l'effet de l'hormone sur la croissance de cultures de rate de lapin a signalé que des concentrations égales ou supérieures à 2,5  $\mu$  semblent augmenter la production des macrophages. Mais, à son avis, cet effet n'est

peut-être qu'apparent, les macrophages donnant l'impression d'être en grand nombre dans les cultures uniquement parce que le développement concomitant des fibroblastes a été anormalement faible.

L'effet toxique provoqué directement par la DOCA et la cortisone sur des cultures de fibroblastes et de cellules endothéliales a été récemment recherché par Cornman [12]. Cet auteur a soumis à l'action de ces produits en suspension dans l'eau physiologique des cultures de cœur de souris nouveau-nées qui avaient déjà subi une certaine croissance dans un milieu composé de sérum et d'extrait embryonnaire. Il a remarqué que la DOC (Delta) à des concentrations de l'ordre de 0.02 mg/ml déterminait une dégénérescence sévère et rapide des fibroblastes et une atteinte moins forte des cellules endothéliales. Les repiquages sur milieu normal favorisaient le développement des cellules endothéliales aux dépens des fibroblastes. L'addition d'une trace de cortisone (0,05 à 0,15 mg/ml) précipitait la marche des processus dégénératifs sans favoriser pour autant la multiplication des cellules endothéliales. L'addition aux cultures de 10 p. 100 de sérum protégeait complètement les cellules contre l'action toxique de la DOC. Dans ces expériences, les acétates de DOC et de cortisone se sont montrés sans influence.

L'action inhibitrice que nous avons personnellement observée peut tenir, à notre avis, soit à la présence dans les plasmas de la cortisone ou de quelque produit apparenté, soit à l'altération ou à la destruction de un ou plusieurs constituants normaux de ces milieux. Etant donné que l'addition de plasma normal diminue, sans toutefois abolir, une telle action inhibitrice, nous pensons que la seconde explication est la moins vraisemblable.

Sans doute, les doses de cortisone nécessaires pour obtenir des résultats positifs sont si fortes qu'on peut difficilement tenir compte de ces derniers pour expliquer parfaitement le mode d'action antiinflammatoire de l'hormone utilisée à dose thérapeutique. Remarquons toutefois que les recherches expérimentales faites pour inhiber le développement d'un granulome inflammatoire chez l'animal montrent que des doses élevées sont en ce cas aussi indispensables.

#### RÉSUMÉ.

Différents plasmas prélevés chez des cobayes traités par une ou plusieurs injections de cortisone ou de DOCA ont été étudiés avec l'espoir de déterminer leur effet sur la croissance de fibroblastes et de macrophages cultivés *in vitro*.

Sur 20 plasmas provenant d'animaux traités par la cortisone, 11 ont exercé une action inhibitrice très nette. Sept ont empêché la croissance des fibroblastes et aussi des macrophages. Quatre



ont empêché la croissance des fibroblastes sans gêner celle des macrophages.

Sur 6 plasmas provenant d'animaux traités par la DOCA, 4 n'ont manifesté aucune action cytotoxique appréciable. Le cinquième a supprimé complètement la croissance des fibroblastes et des macrophages. Le dernier a plutôt stimulé la reproduction de ces deux types de cellules.

Six plasmas fournis par des animaux normaux ont été laissés en présence, à 37°, de cristaux de cortisone pendant des délais variables (de deux à quarante-huit heures). Tous ces plasmas, débarrassés des cristaux par centrifugation, ont été capables, sans exception, d'empêcher *in vitro* la croissance des fibroblastes et des macrophages.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. RAGAN, A. W. CROKOST et R. H. BOOTS. *Am. J. Med.*, 1949, **7**, 741.
- [2] C. RAGAN, C. L. HOWES, C. M. PLOTZ, K. MEYER et J. W. BLUNT. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1949, **72**, 718.
- [3] J. W. BLUNT, C. M. PLOTZ, F. LATTES, E. L. HOWES, K. MEYER et C. RAGAN. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950 **73**, 678.
- [4] M. TAUBENHAUS et G. D. AMROMIN. *J. Lab. a. Clin. Med.*, 1950, **36**, 7.
- [5] FL. COSTE, G. BASSET et A. DELAUNAY. *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145**, 89.
- [6] B. L. BAKER. A. A. S. Symposium on Adrenal Cortex, 1951. Am. Assoc. for advancement of Science, Wash. ; sous presse. (Cité par D. J. INGLE. *J. clin. Endocrin.*, 1950, **10**, 1312.)
- [7] J. COMANDON. *Ces Annales*, 1920, **34**, 1.
- [8] S. W. COSGRIFF, A. F. DIEFENBACH et W. VORT. *Am. J. Med.*, 1950, **9**, 752.
- [9] W. ANTROPOL. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **73**, 262.
- [10] P. D'ARCY HART et R. J. W. REES. *Lancet*, 1950, **2**, 391.
- [11] D. H. HEILMAN. *Proceed. Staff Meet. Mayo clin.*, 1945, **20**, 318.
- [12] I. CORNMAN. *Science*, 1951, **113**, 37.

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>.*)

**Séance du 7 Juin 1951.**

Présidence de M. PRÉVOT.

---

## NÉCROLOGIE

### PAUL COURMONT

(1871-1951)

---

J'ai le regret d'annoncer à notre Société le décès d'un de ses membres fondateurs, le professeur Paul Courmont.

Paul Courmont était né à Lyon le 10 novembre 1871. Elève du professeur Tessier, il parcourt sous son égide les échelons de sa carrière hospitalière où il fut, après son internat, nommé successivement Chef de Clinique en 1897 et Médecin des Hôpitaux en 1903.

Parallèlement P. Courmont poursuit son ascension dans les grades universitaires, commencée en 1892, comme préparateur de la Chaire de Pathologie Interne, puis comme Chef des Travaux de Médecine expérimentale, enfin comme Agrégé de Médecine en 1900, ce qui lui permet d'en terminer avec les épreuves des concours à l'âge où la plupart des candidats en sont encore aux labeurs des années de préparation.

Dès ce moment Paul Courmont peut consacrer une grande partie de son activité à la Médecine expérimentale et à la Bactériologie ; cette orientation se fait sous le double parrainage, qui a exercé sur sa carrière une profonde influence, de Saturnin Arloing et de Jules Courmont son frère aîné. Avec ce dernier s'établit une étroite collaboration qui achève définitivement de consacrer Paul Courmont à l'Hygiène et à la Microbiologie, alors dans l'élan prestigieux de leur premier essor.

En 1911, Paul Courmont succède à S. Arloing à la Chaire de Médecine expérimentale et de Bactériologie : il semble qu'il ait trouvé, dès lors, sa place définitive et que sa carrière se poursuivra désormais sans changement. Mais le destin en a jugé autrement. Jules Courmont, titulaire de la Chaire d'Hygiène où il avait remplacé Bard en 1900, tombe frappé par une hémorragie cérébrale en 1917 et son successeur désigné, Lesieur, disparaît prématurément à son tour.

Cette vacance de la Chaire d'Hygiène qu'avait illustrée si brillamment la puissante personnalité de Jules Courmont, devait y appeler son frère cadet, qui désormais occupera la place de son aîné dont il s'attachera à poursuivre l'œuvre avec une affectueuse piété. Ce n'est qu'au bout de dix-sept ans que Paul Courmont renonce à la Chaire d'Hygiène pour occuper en 1931, et jusqu'à l'âge de la retraite, la Chaire de Clinique et de Prophylaxie de la Tuberculose à laquelle le désigne sa double carrière de clinicien et d'hygiéniste.

Même le temps de la retraite, qui sonne en 1941, ne devait pas interrompre l'activité de Paul Courmont qui a gardé jusqu'à sa mort la Direction de l'Institut Bactériologique de Lyon et la présidence du Centre départemental du Rhône de Lutte contre la Tuberculose.

Au cours de sa longue et laborieuse carrière Paul Courmont s'est consacré principalement à l'étude des maladies infectieuses et à la bactériologie générale. Il a su dans son inlassable activité tenir une balance à peu près égale entre la clinique, l'enseignement, la recherche et les services pratiques de l'Institut Bactériologique. La phthisiologie reconnaît en lui un maître qui a su, particulièrement dans le domaine de la sérologie, faire concourir la clinique et le laboratoire aux progrès de la recherche en même temps qu'au bien du malade.

Membre parmi les tous premiers de l'Association des Microbiologistes de Langue Française, devenue la Société Française de Microbiologie, le professeur Paul Courmont en était probablement le doyen d'âge. Il a pris une part active à la vie de notre Société où il a depuis sa création publié une grande partie de ses travaux de recherches. Lors de ses séjours à Paris il ne manquait jamais d'assister à nos séances. Simple, affable et droit, ne paraissant pas avoir subi l'atteinte des ans, il s'était attiré la sympathie générale. Malgré son âge, il se tenait au courant des perfectionnements les plus récents de la technique bactériologique et ne cessait de manifester un intérêt toujours en éveil pour les problèmes qui sont les nôtres.

Sa disparition sera profondément regrettée par tous les membres de la Société Française de Microbiologie.

P. LÉPINE.

## COMMUNICATIONS

### **Y A-T-IL POSSIBILITÉ DE SYMBIOSE ENTRE LE VIRUS COXSACKIE ET CELUI DE L'ENCÉPHALITE THEILER ?**

par C. LEVADITI et A. VAISMAN.

*(Institut Alfred-Fournier et Institut National d'Hygiène.)*

Dans deux notes antérieures [4, 2], ainsi que dans une troisième présentée en même temps que celle-ci [3], nous avons étudié l'asso-

ciation éventuelle (en d'autre termes la symbiose) entre le virus Cocksackie type *B* neurotrope d'une part, les ultragermes poliomyélique (Lansing), vaccinal et aphteux de l'autre, et cela dans l'encéphale des souriceaux nouveau-nés. Il en est résulté que si, dans ces conditions, aucune symbiose persistante n'est possible entre le virus Cocksackie et ceux de la paralysie infantile et du vaccin jennérien réellement neuronophile, par contre l'agent pathogène de la fièvre aphteuse (également neurotrope) se prête à une telle association au cours de 4 passages effectués sur des souriceaux.

Comment se comportent, du même point de vue, le virus Cocksackie et le virus Theiler de l'encéphalomyélite de la souris? C'est à ce nouveau problème que nous consacrons le présent travail.

La technique utilisée fut la même que celle employée dans nos recherches précédentes. Un mélange de suspensions de cerveaux de 8 souriceaux infectés, par voie transcranienne, avec le virus Cocksackie type *B*, morts ou sacrifiés malades entre le deuxième et le quatrième jour, et de 3 souris adultes contaminées, par la même voie, avec le virus Theiler, est administré dans le névraxe central de 6 souriceaux et de 6 souris adultes (primo-inoculation). On sait que ces souris adultes sont réfractaires au virus Cocksackie et que c'est là un moyen permettant de dissocier la présence simultanée des deux virus chez les souriceaux. Ultérieurement, des passages réguliers ont été effectués. On a enregistré la date des décès et on a examiné le cerveau du point de vue histologique (hématoéline-éosine, Giemsa-lent, bleu de Unna).

De ce dernier point de vue, constatons que les altérations histopathologiques névrauxiques provoquées par le virus Cocksackie (méningite, périvasculite, atteinte des neurones et cœlogénèse [4]), altérations rapidement mortelles, diffèrent essentiellement de celles qu'engendre le virus Theiler chez les souris adultes. Apparaissant après une incubation sensiblement plus longue et ne provoquant le décès que bien plus tardivement, ces altérations intéressent les méninges, les vaisseaux, les plexus choroïdes et surtout la zone externe de la corne d'Ammon, dont les éléments constitutifs deviennent fortement oxyphiles, se nécrobiosent et offrent de la neuronophagie. En cela ces modifications histopathologiques ressemblent à celles engendrées chez la souris adulte par le virus de la fièvre aphteuse neurotrope. Elles permettent de définir ainsi sur coupes la présence simultanée de l'ultragerme Cocksackie et celui de l'encéphalomyélite de Theiler.

Ceci dit, examinons nos résultats consignés dans le tableau ci-contre.

Voici, en bref, les données consignées dans ce tableau :

a) Tous les souriceaux sont morts ou ont été sacrifiés très malades du troisième au cinquième jour au cours de cinq passages consécutifs. La durée de leur processus encéphalitique a été plus longue que celle des souriceaux inoculés avec l'association Cocksackie-virus aphteux (voir note suivante) ;

b) Toutes les souris adultes de la primo-inoculation et des trois premiers passages se sont comportées de même (durée de l'encéphalite : trois à neuf jours), et cela par suite du développement de l'encéphalomyélite de Theiler. Mais, lors du 4<sup>e</sup> transfert, et surtout du 5<sup>e</sup>, ces souris adultes ont survécu et ont été sacrifiées tardivement (soit le quinzième jour), excepté l'une d'elles qui est morte le douzième jour. Or, chez ce



PRIMO-INOCULATION et passages	RÉSULTATS						
	Souriceaux. Coxsackie						
	Total des souriceaux	Morts ou sacrifiés (en jours)	Lésions cérébrales				Total (1)
			+++	+ -	0		
Primo-inoculation . . . .	6	5 <sup>e</sup>	5	1	0	6/6	
1 <sup>er</sup> passage . . . . .	8	4 <sup>e</sup>	8	0	0	8/8	
2 <sup>e</sup> passage . . . . .	7	4 <sup>e</sup>	7	0	0	7/7	
3 <sup>e</sup> passage . . . . .	7	4 <sup>e</sup>	7	0	0	7/7	
4 <sup>e</sup> passage . . . . .	8	5 <sup>e</sup>	8	0	0	8/8	
5 <sup>e</sup> passage . . . . .	6	3 <sup>e</sup>	0	6	0	6/6	
Passage des souris adultes du 3 <sup>e</sup> transfert (3) . . . .	8	3 <sup>e</sup>	3	3	2	6/8	

PRIMO-INOCULATION et passages	RÉSULTATS									
	Souris adultes. Theiler et Coxsackie (2)									
	Total des souris	Mortes ou sacrifiées (en jours)	Lésions cérébrales							
			+++		+ -		0		Total (1)	
			T.	C.	T.	C.	T.	C.	T.	C.
Primo-inoculation . . . .	6	3 <sup>e</sup>	6	0	0	2	0	0	6/6	2/6
1 <sup>er</sup> passage . . . . .	6	au 6 <sup>e</sup> , 3 <sup>e</sup>	6	0	0	2	0	0	6/6	2/6
2 <sup>e</sup> passage . . . . .	5	au 9 <sup>e</sup> , 5 <sup>e</sup>	5	0	0	3	0	0	5/5	3/5
3 <sup>e</sup> passage . . . . .	5	au 6 <sup>e</sup> , 4 <sup>e</sup>	5	0	0	1	0	0	5/5	1/5
4 <sup>e</sup> passage . . . . .	6	au 9 <sup>e</sup> , 12 <sup>e</sup>	1	0	0	0	0	0	1/6	0/6
5 <sup>e</sup> passage . . . . .	6	au 26 <sup>e</sup> , 15 <sup>e</sup>	0	0	0	0	0	0	0/6	0/6
Passage des souris adultes du 3 <sup>e</sup> transfert (3) . . . .	5	4 <sup>e</sup> au 9 <sup>e</sup>	5	0	0	2	0	0	5/5	2/5

(1) Les chiffres placés à droite du trait indiquent le nombre total de souris inoculées; ceux à gauche du même trait le nombre de souris ayant présenté des altérations (+++ intenses, + - légères).

(2) T : Theiler; C : Coxsackie.

(3) Passage des souris adultes du 3<sup>e</sup> transfert sur souriceaux et souris adultes.

dernier sujet seulement il nous a été donné de constater des modifications histologiques du type Theiler, le cerveau des autres s'étant révélé exempt de telles modifications. On en déduira que la symbiose des deux ultragermes, Coxsackie et Theiler, réelle lors de la primo-infection et des 3 premiers passages, s'est transformée, au cours du

4<sup>e</sup> et du 5<sup>e</sup>, en une interférence, le virus Cocksackie se substituant à celui de la névrauxite Theiler ;

c) Fait important : chez les souris adultes, à partir de la primo-inoculation et jusqu'au 3<sup>e</sup> transfert compris, des altérations type Cocksackie sont venues s'ajouter aux lésions Theiler, sous l'aspect de petits foyers localisés dans certaines zones limitées de l'hippocampe ;

d) Le transfert du névraux de souris adultes à des souriceaux et à d'autres souris également adultes a mis en lumière, lors du 3<sup>e</sup> passage, la présence simultanée des deux ultragermes associés.

CONCLUSION. — *La symbiose entre le virus Cocksackie type B et celui de l'encéphalomyélite de Theiler n'est possible que jusqu'au 3<sup>e</sup> transfert chez les souriceaux nouveau-nés. Elle cesse à partir de ce moment, le premier de ces virus se substituant au second. Cette symbiose semble provoquer, par ailleurs, une certaine atténuation de l'activité encéphalitogène du virus Cocksackie lui-même. Il s'agirait, semble-t-il, d'une interférence réciproque des deux ultravirus, apparaissant à un moment donné au cours de passages consécutifs.*

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. LEVADITI et A. VAISMAN. *Ces Annales*, 1951 (sous presse).
- [2] C. LEVADITI et A. VAISMAN. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1614.
- [3] C. LEVADITI et A. VAISMAN. *Ces Annales*, 1951, **84**, 210.
- [4] Formations cavitaires, V. : C. LEVADITI. *Ces Annales*, 1951 (sous presse)

### SYMBIOSE ENTRE LE TYPE B ENCÉPHALITOGÈNE DU VIRUS COXSACKIE ET CELUI DE LA FIÈVRE APHTEUSE NEUROTROPE

par C. LEVADITI et A. VAISMAN.

(Institut Alfred-Fournier et Institut National d'Hygiène.)

Nous avons entrepris récemment l'étude des associations possibles (en d'autres termes des symbioses) entre le virus Cocksackie type B d'une part, et le virus poliomyélitique (souche Lansing) [1], ainsi que celui du vaccin jennérien neurotrophe [2], de l'autre. Inoculés simultanément dans l'encéphale de souriceaux non sevrés, ces ultravirus sont-ils susceptibles de symbiose, ou bien l'un d'eux, le Cocksackie, à évolution térébrante et rapidement mortelle, annihile-t-il le pouvoir pathogène des deux autres ? Nos essais ont montré qu'en ce qui concerne le virus de la poliomyélite, la symbiose est inexistante, en ce sens que le premier de ces ultragermes efface les effets paralysants du second dès le premier transfert de souriceaux à souriceaux. Nous avons expliqué cette interférence en invoquant le fait que l'ultragerme

Coxsackie offre, chez les souriceaux, une incubation de courte durée (quelques heures) et une évolution histopathologique des plus brèves (deux, trois ou quatre jours), tandis que l'incubation du virus de la poliomyélite Lansing et sa pullulation névraxique sont nettement plus prolongées. Il nous est donc apparu tout naturel que celui de ces agents dont l'évolution est précoce et particulièrement violente se substitue au second.

Il en a été de même, quoiqu'à un moindre degré, de l'association entre ce même virus Coxsackie et le vaccin jennérien encéphalitogène (dont nous venons de révéler le véritable neurotropisme chez les souriceaux nouveau-nés [3]). En effet, dès le troisième passage, le potentiel vaccino-gène cérébral (test intradermique-lapin) s'efface, à l'avantage de la persistance constante du virus Coxsackie.

Or, nous venons d'étudier le même problème en nous adressant, cette fois, à l'association entre le virus Coxsackie type B et celui de la fièvre aphteuse neurotrope (découvert par Nagel [4] et Hoffmann [5]). Voici nos résultats :

*Technique.* — Un mélange d'une suspension de cerveaux de 8 souriceaux morts deux à trois jours après avoir été contaminés avec le virus Coxsackie type B de Dalldorf et Sickles [6], et de virus de la fièvre aphteuse neurotrope, est administré cérébralement à 7 souriceaux non sevrés âgés de trois à quatre jours (dilution au 1/10), ainsi qu'à 5 souris adultes, lesquelles, comme on le sait, ne réagissent en aucune manière à la contamination névraxique par la souche B de virus Coxsackie. A partir de cette primo-inoculation, des passages sont effectués régulièrement sur des lots de souriceaux et de souris adultes [7]. On note la date des décès et on pratique l'examen histo-pathologique des encéphales (hématoéine-éosine, Giemsa-lent et bleu de Unna).

Or, l'étude histologique des altérations encéphaliques nous a montré, tout d'abord, l'existence de dissemblances essentielles entre les lésions provoquées par le virus Coxsackie et celles déclenchées par l'ultragerme de la fièvre aphteuse neurotrope. En effet, contrairement aux altérations Coxsackie (altérations à la fois neuroniques, mésogliques et cœlogénétiques [8], décrites par Dalldorf [9], Melnick [10] et par nous-mêmes [11]), celles dues au virus aphteux ne sont ni térébrantes, ni cœlogènes, mais exclusivement neuronophiles, méningées et périvasculaires ; elles intéressent surtout les neurones de la couche externe de la corne d'Ammon et de la corticalité (oxyphilie et neuronophagie), en sorte qu'il est possible de diagnostiquer par un simple examen histo-pathologique du névraxe l'étiologie de l'encéphalopathie, Coxsackie ou aphteuse, ayant provoqué la mort des animaux en expérience.

Ceci dit, considérons l'ensemble de nos résultats, résumés dans le tableau ci-contre.

Voici, en bref, les données consignées dans ce tableau :

- a) Tous les souriceaux sont morts ou ont été sacrifiés malades le deuxième ou le troisième jour au cours des quatre passages effectués ;
- b) Décès constant des souris adultes en deux à quatre jours ;
- c) Présence régulière de lésions Coxsackie chez les souriceaux ayant servi à ces transferts ;
- d) Également constantes ont été les altérations de fièvre aphteuse chez les souris adultes ;

PRIMO-INOCULATION et passages	RÉSULTATS					
	Souriceaux. Test-Coxsackie					
	Total des souriceaux	Morts ou sacrifiés (en jours)	Lésions cérébrales			
			+++	+	0	Total (1)
Primo-inoculation. . .	7	3°	7	0	0	7/7
1 <sup>er</sup> passage. . . . .	8	2°	7	0	0	7/7
2° passage. . . . .	9	2°	9	0	0	9/9
3° passage. . . . .	9	2°	9	0	0	9/9
4° passage. . . . .	8	2°	8	0	0	8/8
Transfert du 3° passage de souris adultes (3).	8	3°	8	0	0	8/8

PRIMO-INOCULATION et passages	RÉSULTATS									
	Souris adultes, Tests-Fièvre Aphteuse et Coxsackie									
	Total des souris adultes	Mortes ou sacrifiées (en jours)	Lésions cérébrales						Total (1)	
			+++		+ -		0			
									Fièvre aphteuse	Coxsackie
Primo-inoculation . . .	5	2° au 4°	5		0		0		5/5	0
1 <sup>er</sup> passage. . . . .	5	2°	5		0		0		5/5	0
			F. A. (2)	C. (2)	F. A.	C.	F. A.	C.		
2° passage. . . . .	5	2° au 4°	5	0	0	5	6	0	5/5	5/5
3° passage . . . . .	5	2°	5	0	0	5	0	0	5/5	5/5
4° passage. . . . .	5	1 <sup>er</sup> au 4°	5	0	0	3	0	0	5/5	3/5
Transfert du 3° passage de souris adultes (3).	4	2° au 4°	5	0	0	5	0	0	5/5	5/5

(1) Les chiffres placés à droite du trait indiquent le total des souris inoculées, ceux placés à gauche du trait le nombre des souris ayant présenté des altérations (+++, intenses; +, légères).

(2) F. A., lésions caractéristiques de l'encéphalite provoquée par le virus aphteux; C., altérations spécifiques du virus Coxsackie.

(3) Passage effectué avec l'encéphale des souris adultes du 3° transfert.



e) Fait important : à partir du deuxième passage intéressant les souris adultes, des lésions type Cocksackie sont venues s'ajouter à ces dernières modifications histologiques. Il s'agit de petits foyers localisés dans certaines zones limitées de l'hippocampe ;

f) Le transfert d'encéphales de souris adultes à des souris et à d'autres souris également adultes a mis en lumière, lors du troisième passage, la présence simultanée des deux ultragermes associés.

CONCLUSION. — *La symbiose entre le virus Cocksackie type B et celui de la fièvre aphteuse neurotrope est possible au cours de 4 transferts consécutifs dans l'encéphale de souris non sevrées. Au surplus, il résulte de nos essais que l'association étudiée engendre, dès le deuxième passage, des altérations de type Cocksackie chez les souris adultes, par ailleurs résistantes à ce virus neurotrope.*

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. LEVADITI et A. VAISMAN. *Ces Annales*, 1951, **81**, 207.
- [2] C. LEVADITI et A. VAISMAN. *C. R. Acad. Sc.*, 1951, **232**, 1614.
- [3] C. LEVADITI et VAISMAN. *C. R. Acad. Sc.*, 1950, **231**, 194 ; *Rev. Immunol.*, 1951 (sous presse).
- [4] NAGEL. *Deutsch. tierärztl. Wochenschr.*, 1937, **45**, 624.
- [5] HOFFMANN. *Zentralbl. Bakt.*, 1941, **48**, 69.
- [6] DALLDORF et SICKLES. *Science*, 1948, **108**, 61.
- [7] Il va de soi que l'utilisation de telles souris adultes permet seule d'affirmer la présence du virus aphteux dans le mélange inoculé à l'origine.
- [8] Formations cavitaires.
- [9] DALLDORF. *Fed. Proc.*, 1950, **9**, 569 ; *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 1950, **26**, 329.
- [10] MELNICK. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 1950, **26**, 342.
- [11] C. LEVADITI. *Semaine des Hôpitaux*, 1950, **26**, 1541 ; *ces Annales* (sous presse).

**SUR LA VIRULENCE PAR VOIE SOUS-CUTANÉE  
DU VIRUS FIXE (SOUCHE PASTEUR)  
POUR LA SOURIS, LE HAMSTER, LE COBAYE  
ET LE LAPIN**

par P. LÉPINE et P. ATANASIU.

(*Institut Pasteur, Service des Virus.*)

La souche Pasteur [1] du virus fixe de Paris, entretenue depuis son origine (19 novembre 1882) sur le lapin, est caractérisée chez cet animal par la constance de la période d'incubation (premiers signes le septième jour, mort le neuvième jour) et de symptomatologie, par l'absence de corps de Negri dans le cerveau et la présence de lésions spéciales de

pyncose nucléaire à type d'inclusion dans les cellules de la couche externe de la corne d'Ammon (Lépine et Sautter [2]). Cette souche ne tue pas le lapin par voie sous-cutanée et se montre pratiquement dépourvue de neuroprobasie (Lépine, Cruveilhier et Sautter [3]). Il est pourtant possible dans certains cas, notamment par l'action de l'hyaluronidase, de lui restituer son infectiosité par voie sous-cutanée et son pouvoir de neuroprobasie (Béquignon, Bussard et Vialat [4]), ce qui démontre, malgré une longue adaptation au lapin, la persistance à l'état latent d'une partie des caractéristiques de la souche originelle.

La souris présente au virus rabique une sensibilité différente de celle du lapin ; elle se montre plus que ce dernier sensible à l'inoculation par voie sous-cutanée, qui est chez elle fréquemment mortelle (Babès [5]. Remlinger [6]. Galli-Valerio [7], puis Fermi [8] ont montré que par passages sur la souris la virulence par voie sous-cutanée peut s'exalter progressivement, et que certaines souches, telle celle du virus Sassari de Fermi, peuvent devenir régulièrement mortelles pour les muridés par la voie sous-cutanée. De telles souches récupèrent en outre la propriété de produire chez le lapin, quoiqu'en petit nombre, des corps de Negri typiques (Lépine et Sautter [9]).

A l'état normal, pourtant, la souche Pasteur du virus fixe ne tue pas la souris par la voie sous-cutanée et sa virulence chez cet animal ne dépasse pas  $10^{-3}$  à  $10^{-4}$  pour un inoculum de 0.03 ml.

Des considérations économiques en même temps que la sensibilité de la souris à la rage en ont fait depuis quelques années l'animal de choix pour les inoculations en vue du diagnostic et surtout pour les essais en série d'immunité active ou passive.

Ayant à procéder à des recherches comparatives tant en vue d'apprécier la valeur de méthodes vaccinales que le titrage d'immunsérums, nous nous sommes heurtés, au début de nos essais, à la faible virulence de la souche Pasteur pour la souris. C'est la raison pour laquelle nous avons cherché à remonter la virulence de la souche pour cet animal au moyen de passages par voie intracérébrale et par voie sous-cutanée. Les modifications de la souche rencontrées au cours de nos essais, nous ont incités à les poursuivre comparativement sur d'autres animaux. Nous rapportons ici les résultats des observations :

**MATÉRIEL ET TECHNIQUE.** — Nos expériences ont débuté en février 1947 avec la souche Pasteur du virus fixe, ayant subi alors mille sept cent quatre-vingts passages pratiqués exclusivement de cerveau à cerveau sur le lapin. Deux passages nous ont servi à titrer la souche et à vérifier que son comportement était demeuré pareil à celui précédemment décrit [3]. A partir du mille sept cent quatre-vingt-deuxième passage, le virus a été entretenu chez la souris de cerveau à cerveau et a servi en même temps à infecter des animaux par voie sous-cutanée.

Pour les dilutions de virus et le calcul des doses, nous avons suivi la méthode de Habel [10] : elle consiste à faire une suspension à 1 : 10 du cerveau infecté dans l'eau distillée renfermant 10 p. 100 de sérum normal de cheval. Le liquide surnageant sert aux dilutions ultérieures. Les souris employées pour l'expérience sont toutes des souris blanches du même âge (5 à 4 semaines) et de même poids (12 à 14 g) ; les souris étaient en majeure partie de lignée Sw, mais il n'a pas été tenu compte

de la lignée génétique ni du sexe dont l'influence sur la maladie est pratiquement négligeable (Johnson et Leach [41]). La souche n'est passée sur le hamster et le cobaye qu'après adaptation à la souris.

RÉSULTATS. — Au premier passage pratiqué sur la souris (15 février 1947) le titre de virulence  $DL_{50}$  par voie intracérébrale était de  $10^{-3.5}$ , identique aux résultats maintes fois obtenus avec la même souche.

Avec les passages de souris à souris par voie intra-cérébrale, nous n'avons pas tardé à constater l'augmentation de la virulence qui atteignait au dixième passage  $10^{-7.5}$  (voir tableau n° 1). Au vingtième passage (18 décembre 1948) nous avons lyophilisé le virus en suivant la technique type de Habel [42]. Le taux de virulence du virus au moment de la lyophilisation était de  $10^{-7.5}$ ; après quatre mois de lyophilisation (9 mars 1949) il était encore de  $10^{-6.5}$ .

TABLEAU I. — Titrage de dix passages sur souris par voie intracérébrale.

TITRAGE numéro	NUMÉRO du passage	DILUTION DU VIRUS CERVEAU INOCULÉ 0,03 CM <sup>3</sup>							DL 50 p. 100
		10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	
1	1	4/4	4/4	0/4	0/4				10 - 3,5
2	6	4/4	4/4	4/4	0/4				10 - 4,5
3	7	4/4	4/4	4/4	4/4	0/4			10 - 5,5
4	8	4/4	4/4	4/4	2/4	2/4	0/4		10 - 5,5
5	9			4/4	4/4	4/4	0/4		10 - 6,5
6	10			4/4	4/4	4/4	2/4	2/4	10 - 7,5

Au trentième passage sur souris, le virus a été essayé par voie sous-cutanée à différents taux de dilution sur des souris, des hamsters et cobayes, ainsi que sur des lapins (tableau II).

1° Chez la souris, le taux de virulence par la voie intracérébrale se maintient à la  $DL_{50}$  du dixième passage. Par contre, pour les souris inoculées par voie sous-cutanée (cuisse ou peau du flanc), la virulence primitivement très faible, a sensiblement augmenté ( $DL_{50}$  :  $10^{-3.62}$ ) pour les animaux recevant 0,1 ml de suspension virulente. Sur les souris inoculées par cette voie, la période d'inoculation dure de quatorze heures à quatre jours, la maladie clinique est de courte durée, la symptomatologie est paralytique.

2° Chez les hamsters (*Cricetus auratus*) la virulence par la voie sous-cutanée est de  $DL_{50} = 10^{-5}$ . La période latente de l'incubation dure jusqu'au septième ou dixième jour, la symptomatologie débute par la paralysie du train postérieur, puis l'animal entre rapidement dans le coma où il demeure trois à cinq jours.

3° Chez le cobaye inoculé par voie sous-cutanée, la  $DL_{50}$  s'est montrée de  $10^{-3.5}$ , la période d'incubation régulière et la maladie constamment paralytique; l'adaptation s'est donc faite pour cet animal parallèlement à celle de la souris.

TABLEAU II. — **Rage fixe, souche Pasteur**  
après trente passages chez la souris (1951).

ANIMAL et voie d'inoculation	DILUTION DU VIRUS								DL 50 p. 100
	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	
Souris, cerveau . . .	0/5	3/5	5/5	5/5					10 <sup>-7,10</sup>
Souris, région sciatique sous-cutanée . .				0/5	1/5	5/5	5/5		10 <sup>-3,62</sup>
Hamster, région sciatique sous-cutanée. . .				1/2	2/2	2/2			10 <sup>-5</sup>
Cobaye, région sciatique, sous-cutanée . .				0/3	1/3	2/3	3/3		10 <sup>-3,5</sup>
Lapin, cerveau . . .						2/2			
Lapin, région sciatique . . . . .							2/2		
Lapin, peau flanc. .								1/2	

4° Chez le lapin inoculé par la voie sous-cutanée (région sciatique), la DL<sub>50</sub> est également de 10<sup>-3,5</sup>. Chez le lapin inoculé par voie intracérébrale, avec le virus de souris dilué à 10<sup>-3</sup>, l'incubation s'est raccourcie à quatre ou cinq jours et l'animal a constamment fait une rage avec symptômes d'excitation confinant à la rage furieuse : l'animal tourne constamment sur lui-même, présente du mâchonnement, mordille sa cage et les objets, a des mouvements brusques et spasmodiques, essaye parfois de s'échapper de sa cage et présente une forte sialorrhée.

Du point de vue anatomo-pathologique, parmi les animaux inoculés par voie sous-cutanée, les lésions les plus intéressantes se rencontrent chez les souris : ce sont des lésions essentiellement pycnotiques du type rage fixe, à côté desquelles on rencontre parfois des corps de Negri de petite taille.

Chez les autres animaux, les lésions sont à peu près exclusivement du type rage fixe. Il est à noter que malgré la présence d'une réaction clinique plus accentuée qu'avec la souche classique, les lésions anatomo-pathologiques sont tout aussi discrètes et ne comportent pas plus de signes de méningo-encéphalite.

CONCLUSION. — Après soixante-cinq ans de passage sur le lapin, la souche de rage fixe Pasteur, au mille sept cent quatre-vingt-deuxième passage, inoculée en série sur souris par voie intracérébrale, voit sa virulence augmenter rapidement pour atteindre, au dixième passage sur souris, le taux DL<sub>50</sub> 10<sup>-7,5</sup> qui est conservé sans changement jusqu'au trentième passage. A partir du vingtième passage la souche se montre virulente par voie sous-cutanée avec une DL<sub>50</sub> de 10<sup>-3,5</sup>. La même virulence par voie sous-cutanée se retrouve chez le hamster, le cobaye et le lapin. Le hamster se montre, de tous les animaux essayés, celui doué de la plus grande sensibilité au virus rabique adapté aux muridés.



Chez le lapin inoculé par voie intracérébrale, le virus adapté à la souris détermine une rage à courte incubation avec agitation et manifestations rappelant la rage furieuse. Chez tous les animaux, les lésions anatomo-pathologiques restent celles de la rage fixe ; toutefois on peut rencontrer, principalement chez la souris, des corps de Negri typiques.

## BIBLIOGRAPHIE

- [4] L. PASTEUR. *Œuvres de Pasteur*, Masson, édit., Paris, 1933, **6**, 590.
- [2] P. LÉPINE et V. SAUTTER. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 542.
- [3] P. LÉPINE, L. CRUVEILHIER et V. SAUTTER. *Ces Annales*, 1935, **55** (supplément), 126.
- [4] R. BEQUIGNON, A. BUSSARD et C. VIALAT. *Ces Annales*, 1949, **76**, 285.
- [5] V. BABÈS. *Virchows Arch.*, 1887, **110**, 574.
- [6] P. REMLINGER. *C. R. Soc. Biol.*, 1904, **56**, 42.
- [7] B. GALLI-VALERIO. *Zentralbl. Bakt.*, I, 1906, **40**, 318-331.
- [8] L. FERMI. *Zentralbl. Bakt.*, I, 1907, **43**, 218.
- [9] P. LÉPINE et V. SAUTTER. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 127.
- [10] K. HABEL. *Publ. Health Rep.*, 1940, **55**, 1473.
- [11] H.-N. JOHNSON et C.-N. LEACH. *Am. J. Hyg.*, 1940, **32**, 38.
- [12] K. HABEL. *Publ. Health Rep.*, 1948, **63**, 44.

**EMPLOI DE L'ŒUF DE CANE  
POUR LA PRÉPARATION DES ANTIGÈNES  
DU GROUPE  
PSITTACOSE-LYMPHOGRANULOMATOSE VÉNÉRIENNE  
EN VUE DE LA DÉVIATION DU COMPLÉMENT**

par P. LÉPINE, V. SAUTTER et L. REINIÉ.

(*Institut Pasteur, Service des Virus.*)

Nous employons au laboratoire, pour le diagnostic des maladies du groupe psittacose-lymphogranulomatose vénérienne par la déviation du complément, des antigènes provenant de la culture de l'un de ces virus en sacs vitellins d'œufs incubés.

Ces antigènes sont préparés suivant la technique générale de Nigg, Hilleman et Bowser [1] que nous avons suivie dans les grandes lignes, et qui permet d'obtenir des antigènes donnant toute satisfaction. Nous les préparons, comme les auteurs précités, à partir de l'œuf de poule fécondé, inoculé au cinquième jour de l'incubation, les sacs vitellins étant prélevés le cinquième ou le sixième jour après l'inoculation.

Depuis un an, nous avons également employé avec un très grand succès des œufs de cane inoculés au cinquième jour de l'incubation, les sacs vitellins n'étant prélevés que du septième au neuvième jour

après l'inoculation, en raison du développement plus lent de l'embryon chez cette espèce.

Les avantages de principe que nous avons trouvés à employer des œufs de cane sont les suivants :

a) Moindre prix de revient des œufs de cane, la demande en étant presque inexistante sur le marché ;

b) Volume plus grand de l'œuf et masse pondérale du sac vitellin plus élevée qu'avec l'œuf de poule ;

c) Elimination au cours des réactions de déviation du complément des réactions aberrantes qui pourraient être dues à la sensibilisation de l'homme aux protéines de l'œuf de poule.

Il est classique néanmoins d'admettre que l'œuf de cane convient moins bien que l'œuf de poule à un travail bactériologique stérile, en raison de la fréquence de la contamination bactérienne (*Salmonella*, etc.) des milieux de l'œuf chez la cane.

Nos observations ne confirment pas cette opinion, et nous n'avons pratiquement pas rencontré de contaminations bactériennes ; peut-être ce fait est-il dû à ce que les œufs que nous recevons proviennent de la ferme de l'Institut Pasteur où ils sont trapnestés comme les œufs de poule au lieu d'être pondus dans la vase.

La technique générale de préparation de l'antigène (qu'il s'agisse de l'œuf de poule ou de l'œuf de cane) est la suivante :

1° Le prélèvement des sacs vitellins des œufs inoculés avec une souche connue pour son pouvoir antigénique élevé a lieu lorsque les œufs inoculés présentent un ralentissement des mouvements de l'embryon et un début de mortalité. Les sacs vitellins sont prélevés stérilement de la manière habituelle et, s'ils ne doivent pas être employés immédiatement, sont congelés à très basse température.

2° Les sacs vitellins, pesés, sont broyés finement au Waring blender, puis dilués à 10 p. 100 en eau physiologique additionnée d'acide phénique à 0,5 p. 100. On obtient finalement une émulsion couleur jaune-d'œuf dont on remplit des flacons bouchés contenant des billes de verre. Les flacons sont mis à vieillir dans l'étuve à 37° C, en ayant soin de les agiter plusieurs fois par jour pendant trois semaines. A l'expiration de ce temps, les flacons sont placés au bain-marie bouillant pendant une demi-heure, ce qui a pour effet d'augmenter considérablement la puissance de l'antigène (Nigg et Bowser [2]).

3° Après ce traitement, l'antigène est centrifugé en une ou plusieurs fractions. C'est là l'opération la plus délicate de la préparation. Il s'agit d'éliminer, d'une part, les gros débris cellulaires sédimentant facilement et, d'autre part, la couche de matière lipidique, légère et fragile, qui tend à se former à la surface et à se disperser aussitôt que la centrifugation est arrêtée. Celle-ci a lieu généralement à 5 000 t/m et dure une demi-heure environ. Il est quelquefois nécessaire de la répéter pour réussir un bon prélèvement de la couche moyenne ne contenant ni gros débris, ni lipides en suspension, et ceci sans perdre un trop grand volume d'antigène.

4° D'autre part, des œufs de poule ou de cane fécondés non inoculés sont mis en incubation, et leurs sacs vitellins sont prélevés le douzième jour pour les œufs de poule, le quatorzième jour pour les œufs de

cane. Les sacs vitellins sont traités exactement de la même façon que les sacs vitellins des œufs inoculés suivant la description qui précède, afin de constituer un antigène témoin normal qui sera utilisé à titre de contrôle au cours des réactions, où l'on aura soin, bien entendu, d'employer un antigène témoin de même espèce animale, poule ou cane, que l'antigène spécifique servant à la réaction.

5° A ce stade, la préparation proprement dite de l'antigène spécifique est achevée, mais il reste à en éprouver la valeur pour ne conserver que les lots satisfaisants.

On titre alors le pouvoir anticomplémentaire de l'antigène obtenu. Celui-ci doit être nul pour une dilution au 1 : 20, faible ou nul pour une dilution au 1 : 10 ; il est souvent insignifiant, même à la dilution au 1 : 5.

6° On titre ensuite le pouvoir antigénique spécifique sur un sérum positif. Ce sérum est toujours du sérum d'infection naturelle provenant d'un ou plusieurs malades à réactions positives. Il est conservé à l'état congelé et sert au titrage des nouveaux antigènes. La réponse de cette réaction est essentielle. Un bon antigène contient au moins 1 unité dans 0,25 cm<sup>3</sup> de la dilution à 1 : 30 ; ce taux est habituellement largement dépassé et peut atteindre 1 unité dans 0,25 cm<sup>3</sup> d'antigène à 1:100.

7° On vérifie alors, sur l'antigène ayant passé avec succès les épreuves précédentes, l'absence de déviation du complément non spécifique en présence de sérums syphilitiques donnant une réaction de B.-W. positive. Le sérum B.-W. positif peut être constitué par le mélange de plusieurs sérums humains donnant une réaction positive.

8° On s'assure, par une déviation du complément pratiquée avec un sérum anti-œuf, que le complément est dévié au moins également par un antigène témoin normal (voyez ci-dessus) et par l'antigène spécifique dilué à 2 unités par tube ; ceci afin de garantir, lors de l'exécution de la réaction, la valeur de l'antigène comparé au témoin normal par rapport aux réactions anti-œuf pouvant résulter de sensibilisations allergiques.

9° La préparation du sérum anti-œuf est elle-même exécutée de la façon suivante : des œufs fécondés non inoculés sont mis à incuber, et sont prélevés le douzième jour pour les œufs de poule, le quatorzième jour pour les œufs de cane. On réunit les sacs vitellins, la membrane chorio-allantoïde, ainsi que les liquides allantoïque et amiotique et l'on broie le tout finement au Waring blendor. L'émulsion obtenue est inoculée par voie sous-cutanée à des lapins, en injectant le premier jour 1 cm<sup>3</sup>, le quatrième jour 1,5 cm<sup>3</sup> et les huitième et douzième jours 3 cm<sup>3</sup>. Les animaux sont saignés à blanc le vingtième jour ; leur sérum constitue le sérum anti-œuf.

10° Pour l'exécution de la réaction elle-même, nous renvoyons aux articles et traités qui en donnent le schéma détaillé (J. C. Levaditi [3], P. Lépine [4]).

Il y a lieu de souligner que, quels que soient le soin et la minutie apportés à la préparation de tels antigènes, ceux-ci n'en sont pas moins obtenus de façon toute empirique et que, d'un lot à l'autre, la valeur des antigènes peut, sans raison apparente, se montrer très variable, voire même nulle. D'où l'importance du titrage et des réactions de contrôle pratiquées sur l'antigène en cours et en fin de préparation avec

les différents sérums qui permettent seuls d'en apprécier la valeur. D'après notre expérience, une fois achevé, l'antigène est utilisable pendant deux ans s'il est conservé à la glacière.

Il arrive, enfin, que certains sérums humains présentent des réactions anormales, vraisemblablement du type allergique, en présence des antigènes de poule, parfois de certains seulement d'entre eux. De tels sérums sont exceptionnels : nous en avons néanmoins rencontré plusieurs. En ces cas, révélés par le comportement des témoins dans la réaction, nous avons pris l'habitude de doubler les réactions faites avec les antigènes de poule d'une réaction pratiquée avec l'antigène de cane. En voici un exemple : un sérum humain (examen 51-94) mis en présence de divers antigènes, dont aucun, bien entendu, n'est doué de pouvoir hémolytique dans les tubes témoins, donne avec un antigène de poule spécifique n° 1 une réaction positive à 1 : 40 et avec un antigène témoin normal de poule une réaction positive de même à 1 : 40. Il s'agit donc d'une réaction anormale ; le même sérum donne une réaction négative avec les témoins faits en présence d'eau physiologique, avec les différents antigènes de cane, et avec des antigènes de poule, spécifiques ou témoins, de fabrication récente.

En pareils cas, la réaction effectuée en présence d'antigènes de cane nous permet d'éliminer les réactions aberrantes qui se produisent aussi bien avec des antigènes de poule « normaux » qu'avec des antigènes de poule spécifiques.

Nous n'avons pas, jusqu'ici, rencontré de sérums humains sensibilisés à l'antigène de cane. La nature de ces sensibilisations de sérums humains est, du reste, assez mystérieuse. Elle ne paraît pas correspondre aux sérums d'individus sensibilisés à l'ovalbumine, si nous en jugeons par nos observations dans le cas du sérum 51-313, qui nous a été envoyé par le Dr Halpern, d'un malade présentant une hypersensibilité des plus accusées et des plus caractéristiques à l'ovalbumine : ce sérum s'est comporté, vis-à-vis de l'antigène spécifique de poule et d'un antigène normal de poule, comme un sérum entièrement normal, donnant une hémolyse totale à 1 : 10.

Les sensibilisations des sérums humains aux antigènes de poule sont donc imprévisibles. Cette constatation donne d'autant plus de valeur à l'emploi des œufs de cane pour préparer des antigènes, lesquels se sont, d'autre part, montrés, dans nos essais, d'excellents antigènes spécifiques pour l'exécution de réaction de déviation du complément dans les affections du groupe psittacose-lymphogranulomatose vénérienne.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. NIGG, M. R. HILLEMANN et B. M. BOWSER. *J. Immunol.*, 1946, **53**, 259-268.
- [2] C. NIGG et B. M. BOWSER. *Proc. Soc. exp. Med. et Biol.*, 1943, **53**, 192.
- [3] J. C. LEVADITI, in : C. LEVADITI et P. LÉPINE. *Les ultravirus des maladies humaines*, 2<sup>e</sup> édition, Maloine, Paris, 1948, 1121.
- [4] P. LÉPINE, in : J. DUMAS et collaborateurs. *Bactériologie médicale*, Ed. Médicales, Flammarion, Paris, 1951, 925.



## ANTIBIOTIQUES ET LYSE BACTÉRIOPHAGIQUE

### IX. — L'ACTION DE LA TERRAMYCINE SUR LA LYSE BACTÉRIOPHAGIQUE, ÉTUDIÉE AU MICROBIOPHOTOMÈTRE

par EWALD EDLINGER et MICHEL FAGUET.

(Service du Bactériophage, Institut Pasteur, Paris.)

Poursuivant l'étude de l'influence des antibiotiques sur la lyse bactériophagique entreprise dans ce laboratoire (P. Nicolle et Faguet, 1947 [1, 2], Faguet et Edlinger [3, 4, 5], Edlinger et Faguet [6, 7]), nous avons voulu observer, à l'aide du microbiophotomètre de M. Faguet [8], les effets d'un nouvel antibiotique, la terramycine, sur la lyse d'une culture bactérienne par le bactériophage.

*Technique.* — Comme dans nos expériences antérieures (*loc. cit.*), nous avons utilisé le staphylocoque blanc Twort et le bactériophage homonyme, dont l'action lytique n'est suivie qu'exceptionnellement de l'apparition de cultures secondaires (P. Nicolle et P. Ducrest [9]) et, pour une autre série d'expériences, le staphylocoque blanc dont les cultures secondaires ont été étudiées par P. Nicolle et G. Conge [10].

Les six tubes du microbiophotomètre, contenant chacun 20 cm<sup>3</sup> d'eau peptonée à 1 p. 100 (peptone UCLAF) et 1,5 p. 100 de glucose, étaient ensemencés avec environ 200 000 germes par centimètre cube, provenant d'une culture de dix-huit heures sur gélose inclinée.

Le titre des bactériophages employés a été, dans toutes les expériences, sensiblement le même, environ  $4 \cdot 10^7$  corpuscules par centimètre cube pour le phage Twort et  $8 \cdot 10^8$  pour le phage N. Les bactériophages étaient introduits dans les cultures au milieu de la phase exponentielle. La terramycine provenait d'une capsule commerciale et était diluée dans l'eau bidistillée jusqu'aux dilutions nécessaires pour nos expériences. La solution-mère était gardée à la glacière.

*Expériences.* — La figure 1 montre la croissance normale de la culture staphylococcique et la lyse normale par le bactériophage Twort. Si on ajoute 0,5 µg de terramycine par centimètre cube, la croissance n'est que très faiblement ralentie, mais la lyse est retardée. Si on ajoute 1 µg de terramycine par centimètre cube, la croissance bactérienne est plus fortement ralentie, mais la lyse bactériophagique ne se manifeste que par une faible diminution de l'opacité optique ; 2,0 µg de terramycine inhibent complètement la lyse.

Dans d'autres expériences, la terramycine a été ajoutée à la culture bactérienne une heure avant l'addition du phage ; nous avons obtenu des résultats superposables, qu'il nous paraît inutile, par conséquent, de reproduire.

La figure 2 représente les courbes des expériences dans lesquelles la

terramycine a été ajoutée après l'introduction du bactériophage Twort dans la culture bactérienne. Si on introduit 0,5  $\mu\text{g}$  de terramycine par

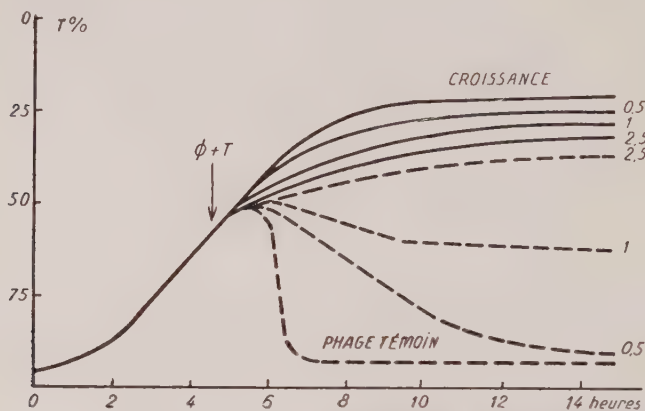


FIG. 1. — Action du phage Twort et de différentes doses de terramycine ajoutées simultanément. Les courbes « croissances » et « phages témoins » montrent la croissance et la lyse normales,  $\Psi$  Intervention.  $\phi$  Phage. T, Terramycine (0,5, 1,0, 2,5  $\mu\text{g}$  par centimètre cube de culture).

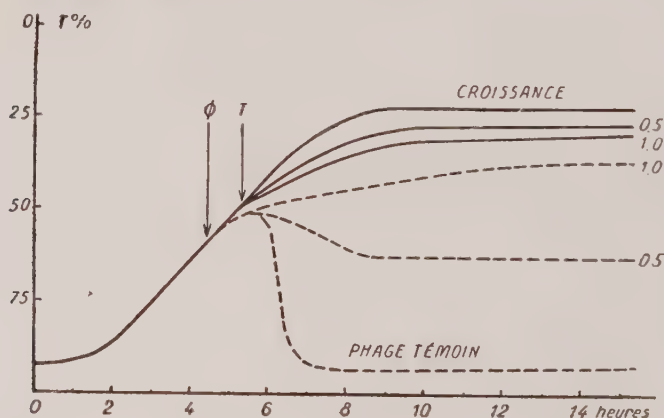


FIG. 2. — Action de la terramycine lorsque le phage est préalablement introduit dans la culture. Les courbes « croissances » et « phage témoin » montrent la croissance normale et la lyse normale, lorsque la dernière culture reçoit le phage au moment  $\phi$ . Les courbes 0,5 1,0 ( $= \mu\text{g}$  de terramycine par centimètre cube de culture) en traits pleins ne reçoivent que l'antibiotique; les mêmes courbes en pointillé ont reçu préalablement le phage.

centimètre cube, la lyse n'est qu'amorcée; si la concentration de l'antibiotique est de 1  $\mu\text{g}$ , il n'y a aucune diminution de l'opacité de la culture.

Dans la figure 3 sont réunis les résultats des expériences, dans lesquelles la culture bactérienne reçoit 0,5  $\mu\text{g}$  et 1  $\mu\text{g}$  de terramycine, mais en même temps le phage N. Les témoins permettent de suivre la courbe de la croissance et de la lyse. Cette dernière est suivie de l'apparition d'une culture secondaire. La culture qui a reçu 0,5  $\mu\text{g}$  de terramycine et le phage N subit une lyse ralentie et la culture secondaire croissante n'apparaît que plus tardivement et plus lentement. La culture qui a reçu 1  $\mu\text{g}$  de terramycine montre une très faible diminution de l'opacité, suivie tardivement par une légère augmentation. Ces variations de la densité optique peuvent être interprétées comme une ébauche de lyse bientôt interrompue.

*Discussion.* — Comme avec les autres antibiotiques, l'effet de la terra-

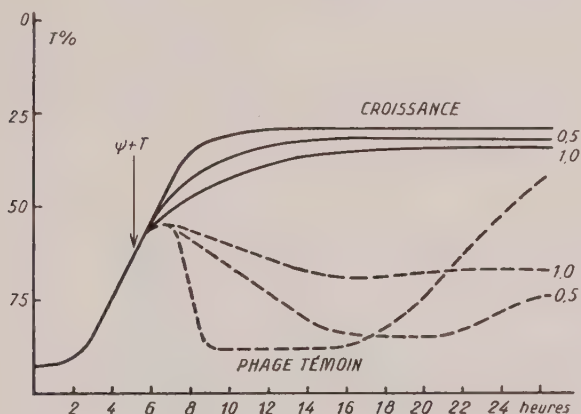


Fig. 3. — Action de la terramycine et d'un phage N sur une culture staphylococcique. Les courbes « croissance » et « phage témoin » montrent la croissance normale et la lyse normale.  $\psi$  Intervention,  $\varphi$  Phage, T, Terramycine (0,5, 1,0, 2,5  $\mu\text{g}$  par centimètre cube de culture).

mycine sur la lyse bactériophagique diffère non seulement quantitativement, mais aussi qualitativement suivant la concentration employée. Il est compréhensible qu'une concentration au-dessus du taux bactériostatique empêche la lyse. Pour les concentrations sub-bactériostatiques, la terramycine introduite en même temps ou avant le phage dans la culture bactérienne retarde ou inhibe partiellement la lyse. Et fait surprenant, cette lyse est, à concentrations égales, plus fortement inhibée, lorsque l'antibiotique est ajouté après le phage. Si l'inhibition de la lyse était due à l'action bactériostatique de l'antibiotique, on serait en droit d'attendre plutôt un affaiblissement de l'effet antilytique, parce que la fixation des corpuscules bactériophages sur les bactéries et la lyse non perceptible des cellules infectées en premier se sont déjà produites. Il n'en est rien. Il faut donc admettre que la terramycine possède une action antilytique. Cette action antilytique consiste peut-être en une lésion des récepteurs bactériens, plus sensibles que les fonctions de la vitalité de la

bactérie à l'attaque de l'antibiotique, ou une action antiphage, c'est-à-dire une perturbation dans la multiplication du phage.

Les résultats obtenus avec le phage N suggèrent que l'action antilytique de l'antibiotique est dans ce cas plus faible qu'avec le phage Twort.

Il est évident que ces expériences ne peuvent donner qu'une orientation sommaire pour des recherches ultérieures. Néanmoins, nous constatons une fois de plus des différences dans l'action des antibiotiques sur la lyse bactériophagique. L'action de la terramycine, quoique non identique, ressemblerait plus à celle de la chloromycétine [4, 7] et de l'auréomycine [5] qui sont douées elles aussi d'un effet antilytique, qu'à l'action de la pénicilline [1, 2] et de la streptomycine [3, 6] pour lesquelles la bactériostase détermine tout une série de phénomènes.

RÉSUMÉ. — Avec des doses sub-bactériostatiques de terramycine, on peut ralentir ou empêcher partiellement la lyse d'un staphylocoque par son phage homologue. Cette action antilytique de la terramycine est renforcée si l'antibiotique est ajouté après le phage.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. NICOLLE et M. FAGUET. *Ces Annales*, 1947, **73**, 490.
- [2] M. FAGUET et P. NICOLLE. *Ces Annales*, 1947, **73**, 1150.
- [3] M. FAGUET et E. EDLINGER. *Ces Annales*, 1949, **77**, 204.
- [4] M. FAGUET et E. EDLINGER. *Ces Annales*, 1950, **79**, 472.
- [5] M. FAGUET et E. EDLINGER. *Ces Annales*, 1951, **80**, 281.
- [6] E. EDLINGER et M. FAGUET. *Ces Annales*, 1949, **78**, 144.
- [7] E. EDLINGER et M. FAGUET. *Ces Annales*, 1950, **79**, 436.
- [8] M. FAGUET. *Act. Sci. et Ind.*, Hermann, édit., Paris, 1941.
- [9] P. NICOLLE et P. DUCREST. *Ces Annales*, 1947, **73**, 755.
- [10] P. NICOLLE et G. CONGE. *Ces Annales*, 1949, **76**, 381.
- [11] P. NICOLLE. *Biologie médicale*, 1949, **38**, suppl.

## INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE SUR LA PRODUCTION DES AGGLUTINOGENES STAPHYLOCOCCIQUES

par J. PILLET, P. MERCIER et M<sup>me</sup> B. ORTA.

(*Institut Pasteur. Annexe de Garches.*)

Au cours de recherches sur la classification des staphylocoques par la technique de l'agglutination spécifique, nous avons été amenés à constater des différences importantes et régulières dans le taux des agglutinations selon le milieu où avaient proliféré les germes utilisés dans ces réactions. La connaissance de cette variation dans la production des agglutinogènes, aisément reproductible, facilitera vraisemblablement



l'étude des substances nécessaires à l'élaboration de ces agglutinogènes, et permettra peut-être d'obtenir certaines indications sur leur nature.

Nous avons, par ailleurs, étudié parallèlement la production d'hémolyse  $\alpha$  et de coagulase dans les mêmes milieux. L'élaboration de toxine  $\alpha$  varie dans le même sens et dans une proportion comparable à celle des agglutinogènes, alors que la production de coagulase semble peu influencée par la nature des différents milieux utilisés.

**MATÉRIEL ET TECHNIQUES.** — *Milieu.* — Nous avons utilisé 3 milieux dont la composition est la suivante et que nous désignerons, pour simplifier, par A, B, C.

*Milieu A.*

Digestion papainique de viande de veau . . . . .	500 cm <sup>3</sup>
Hydrolysate de gélatine . . . . .	20 cm <sup>3</sup>
Citrate trisodique . . . . .	3 g
Phosphate monopotassique . . . . .	8 g
Glucose . . . . .	5 g
Eau physiologique . . . . .	Q. s. 1 000 cm <sup>3</sup>

*Milieu B.*

Digestion papainique de viande de veau . . . . .	500 cm <sup>3</sup>
Eau physiologique . . . . .	500 cm <sup>3</sup>

*Milieu C.*

Peptone U.C.L.A.F. . . . .	20 g
Glucose . . . . .	5 g
Eau physiologique . . . . .	1 000 cm <sup>3</sup>

*Souches.* — La production d'agglutinogènes a été recherchée avec les souches originales de Cowan, caractéristiques des groupes I, II, III, à l'aide d'antisérums homologues et hétérologues. La toxinogénèse  $\alpha$  a été étudiée avec la souche Wood 46 et l'élaboration de coagulase avec 2 souches de la collection donnant des réactions très nettes à ce test.

*Techniques.* — Les techniques de préparation des antisérums, de mise en évidence des agglutinogènes, de la toxine  $\alpha$  et de la coagulase ont été décrites précédemment [1, 2].

**RÉSULTATS.** — Les résultats moyens obtenus dans la recherche des taux d'agglutination à l'aide d'antisérums homologues peuvent se résumer ainsi :

SOUCHES	TYPES	MILIEU A	MILIEU B	MILIEU C
6127. . . . .	I	1/1 000	1/750	< 1/50
6128. . . . .	II	1/1 500	1/1 000	1/100
6130. . . . .	III	1/1 000	1/1 000	1/50

Les agglutinations croisées étant la règle avec les staphylocoques, nous avons répété l'expérience en employant des antisérums hétérologues ; les résultats ont été analogues.

Les chiffres précédents montrent clairement qu'il existe une diminution très marquée du taux de l'agglutination (de l'ordre de 90 p. 100), selon que le germe s'est multiplié en milieu A et B d'une part, ou en milieu C d'autre part.

Les conséquences immédiates de ces faits sont que les souches types I, II, III et, d'une manière générale, l'ensemble des souches de staphylocoques, deviennent inclassables par la technique des sérums absorbés lorsqu'elles se sont développées en milieu C. Les sérums utilisés sont en effet, dans ce cas, dilués uniformément au 1/50 avant absorption.

Le milieu n'exerce aucune action inhibitrice directe sur l'agglutination spécifique, comme on peut s'en assurer en émulsionnant des germes ayant poussé en milieu A, soit avec de l'eau physiologique, soit avec du milieu C ; les taux d'agglutination restent identiques.

Les staphylocoques donnant cependant de meilleures émulsions en milieu C, nous avons pris l'habitude de les émulsionner dans ce milieu lors de nos recherches sur la classification sérologique de ces germes.

Nous rappellerons, par ailleurs, que B. Hobbs [3] a constaté que la présence de glucose dans le milieu de culture permettait d'obtenir fréquemment des émulsions stables avec des germes qui, cultivés en milieu non sucré, agglutinent spontanément. Nous avons confirmé ce fait à l'occasion de ces recherches ; toutefois, l'action du glucose ne suffit pas à expliquer les résultats que nous avons obtenus, la proportion de sucre présent dans le milieu A en particulier étant au moins égale à celle du milieu C.

*Influence du pH.* — Le milieu C étant peu tamponné, il s'acidifie rapidement et il était possible que cette acidification empêchât la formation normale des agglutinogènes. Il ne semble pas que cette hypothèse soit valable, car, si l'on neutralise à la soude le milieu de culture au fur et à mesure de la prolifération des germes ou si l'on ajoute de l'urée au milieu (les staphylocoques élaborant une uréase très active), les résultats restent identiques en milieu neutralisé ou non.

*Développement des cultures.* — La comparaison de la richesse des cultures selon le milieu, après dix-huit heures d'étuve à 37°, peut être exprimée ainsi :

$$C \geq A > B$$

PRODUCTION D'HÉMOLYSINE ET DE COAGULASE SUR LES DIFFÉRENTS MILIEUX. — La production d'hémolysine  $\alpha$  en milieu liquide selon les méthodes habituelles donne en moyenne les résultats suivants :

Milieu A = 10 Unités. Milieu B = 5 Unités. Milieu C = 1 Unité.

Il semble donc exister un certain parallélisme entre la diminution de la production d'agglutinogène et celle d'hémolysine  $\alpha$  selon le milieu de culture.

Les temps de coagulation du plasma citraté par des cultures tuées provenant des différents milieux sont, par contre, très voisins ainsi que le titre de la dilution minima active des différentes coagulases obtenues de cette manière. Nous avons effectué cette recherche d'une part sur les cultures totales tuées, d'autre part sur le liquide surnageant après centrifugation et enfin sur l'émulsion de germes tués et lavés. Dans les deux premières séries d'expériences, nous avons dilué le plasma au 1/5 avec une dilution de citrate trisodique à 10 p. 100, car le milieu C non ensemencé provoque fréquemment la coagulation du plasma dilué au 1/5 avec de l'eau physiologique.

INFLUENCE DES REPIQUAGES SUCCESSIFS. — Après 15 repiquages à trois

jours d'intervalle en milieu C les résultats obtenus dans ces différents tests sont identiques. On ne constate donc pas, dans les limites de temps de l'expérience, d'adaptation des staphylocoques à ce milieu et la production des agglutinogènes en particulier reste très faible malgré les repiquages successifs.

**RÉSUMÉ ET CONCLUSION.** — La production d'agglutinogène spécifique par les staphylocoques subit une variation régulière et considérable de l'ordre de 90 p. 100, selon le milieu où le microbe a été cultivé.

Si l'on dose l'hémolysine  $\alpha$  produite dans les mêmes milieux, on note une variation parallèle de la quantité de toxine élaborée, alors que la production de coagulase paraît peu influencée par le milieu.

Les résultats de ces tests restent identiques après 15 repiquages à trois jours d'intervalle dans les différents milieux.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. MERCIER, J. PILLET et P. CHABANIER. Ces *Annales*, 1950, **78**, 457.
- [2] J. PILLET. *Thèse de Médecine*, Paris, 1948.
- [3] B. C. HOBBS. *J. Hyg.*, 1948, **46**, 222.

### **LA GÉLOSE-GÉLATINE DE LEGROUX MILIEU DE CULTURE DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

par L. SECOND et R. CHATELAIN.

(*Institut Pasteur, Laboratoire de la Collection.*)

La gélose-gélatine profonde, milieu de culture créé par R. Legroux en 1938 (voir *Cours de l'Institut Pasteur* 1938-1939, p. 67) est un milieu servant aussi bien à l'isolement des germes aérobies qu'à celui des germes anaérobies. La croissance y est plus rapide et le prélèvement des colonies plus aisé que dans les tubes de gélose profonde de Veillon.

Dans ce milieu additionné de facteurs de croissance, qu'il s'agisse de sérum-ascite et d'extrait globulaire ou de plasma, les germes poussent rapidement lors de l'isolement à partir de l'organisme et leur culture rapide rend ce milieu particulièrement utile en ce qui concerne la séparation des germes des suppurations pluri-microbiennes ou des contrôles de stérilité dans lesquels il est indispensable d'obtenir avec la technique la plus simple possible, la certitude d'absence de germes aérobies ou anaérobies.

Au cours de l'utilisation de ce milieu, en vue de diagnostic bactériologique utilisé en clinique, il nous a été donné d'ensemencer ce milieu avec des produits de suppuration tuberculeuse dans lesquels il fallait vérifier l'absence de tout germe d'association.

I. *Pus d'abcès froid d'un nourrisson suspect de tuberculose.* — Ce pus est ensemencé sur milieu de Löwenstein pour y rechercher le *Mycobacterium tuberculosis* et en gélose-gélatine de Veillon (avec adjonction de sérum et d'extrait globulaire) en vue de la détection de germes pathogènes autres que lui.

Sur milieu de Löwenstein, après quinze jours d'étuve à 37°, des colonies apparaissent, typiques d'une croissance de bacilles tuberculeux.

En gélose-gélatine profonde, aucune culture n'est apparue les premiers jours, mais les tubes gardés en observation ont montré, après trois semaines, de fines colonies légèrement arborescentes de 1 mm



Colonies de *Mycobacterium tuberculosis*  
en gélose-gélatine de Legroux après 3 semaines d'étuve à 37°.

de diamètre environ, se situant près de la surface dans la zone d'aérobiose (1 cm 1/2 de hauteur environ).

L'examen microscopique, par la méthode de Ziehl-Neelsen, d'une de ces colonies, a montré la présence de germes acido-résistants caractéristiques.

II. *Pus reçu d'un hôpital pour recherche de « Brucella melitensis ».* — Du fait des renseignements cliniques joints à l'envoi nous avons suspecté une tuberculose. Nous avons ensemencé systématiquement le produit sur milieu de Löwenstein et en gélose-gélatine profonde (avec adjonction de sérum et d'extrait globulaire). Nous avons obtenu les mêmes résultats que précédemment aussi bien d'après l'aspect des colonies que des germes examinés au microscope après coloration de Ziehl-Neelsen.

III. *Pus d'un ganglion de cobaye tuberculeux.* — Le ganglion est prélevé aseptiquement et le pus ensemencé : 1° sur milieu de



Löwenstein ; 2° en gélose-gélatine profonde (avec adjonction de sérum et d'extrait globulaire). A titre de contrôle, 3 tubes de gélose-gélatine profonde, sans adjonction de facteurs de croissance, ont été également ensemencés. Nous avons obtenu les mêmes résultats qu'en I et II mais la culture a été négative en gélose-gélatine profonde dépourvue de facteurs de croissance. Ceux-ci sont donc indispensables à la croissance du bacille tuberculeux.

IV. Nous avons réalisé des essais identiques avec des souches de la collection de l'Institut Pasteur : souche tuberculeuse humaine « Ratti », souche H 37 R V, souche bovine « Vallée », et enfin, avec une souche humaine récemment isolée provenant du laboratoire de la tuberculose. Les résultats ont été absolument comparables aux précédents.

Ensuite nous avons étudié les conservations des germes acido-résistants dans ce milieu. Ces cultures en gélose-gélatine profonde ont été conservées huit mois à l'étuve et elles étaient encore repiquables ; mais elles ne l'étaient plus après un an de conservation dans les mêmes conditions.

Des faits ainsi observés, il est possible de déduire les conclusions suivantes :

Le bacille tuberculeux peut se développer dans la zone d'aérobiose en milieu de gélose-gélatine de Legroux à condition d'y adjoindre du sérum et de l'extrait globulaire ou du plasma, facteurs indispensables à sa croissance dans ce milieu.

La culture y est plus lente et plus pauvre que sur milieu de Löwenstein ou sur pomme de terre glycinée et on ne saurait penser à utiliser ce milieu pour les techniques habituelles de culture dans les laboratoires de tuberculose.

Cependant, au cours de l'isolement des germes en provenance d'organisme infecté, il peut permettre directement l'isolement des souches, et d'autre part, dans les contrôles de stérilité destinés à la préparation de vaccin, par exemple, la culture en gélose-gélatine profonde permet de vérifier avec une seule manipulation l'absence de germes banaux aérobies, ou de germes anaérobies, ou même de bacilles acido-résistants à condition de conserver les tubes pendant plusieurs semaines à l'étuve à 37°.

## **ASSOCIATION DE *SPHEROPHORUS GLYCOLYTICUS* ET DE *RISTELLA PSEUDO-INSOLITA* DANS UN PUS PLEURAL**

par E. R. BRYGOO.

(Institut Pasteur de Saïgon.)

Si les appendicites gangréneuses peuvent classiquement être à l'origine de suppurations à distance au cours desquelles la flore endogène des anaérobies trouve une occasion propice de manifester son

pouvoir pathogène occasionnel, l'isolement chez un même malade, à huit jours d'intervalle, de deux germes anaérobies dont l'un était une espèce nouvelle alors, et l'autre une variété au moins peu commune, mérite peut-être d'être signalé.

Le malade chez qui ces germes ont été isolés a fait l'objet d'une communication des D<sup>rs</sup> Soulage et Evrard à la réunion médico-chirurgicale de Saïgon-Cholon du 8 décembre 1950. Ces auteurs n'ont considéré que le point de vue clinique et thérapeutique, leur malade a été guéri par un traitement prolongé à la terramycine.

Il s'agit d'un militaire caodaïste, H. V. T., qui, opéré au huitième jour d'une perforation d'appendicite, fait ultérieurement un épanchement péricardique et un épanchement pleural. Le liquide péricardique ne contient ni cellule ni germe, par contre le liquide pleural est franchement purulent.

Ce premier examen montre, à côté de nombreux polynucléaires, des cocci Gram-positifs et de fins bacilles Gram-négatifs. Un staphylocoque blanc pousse en aérobie, un streptocoque en anaérobie, le bacille Gram-négatif ne peut être cultivé.

Un nouvel examen du pus pleural, prélevé dix jours plus tard, ne nous parvient, à la suite de difficultés de transport, qu'avec quarante-huit heures de retard. Après coloration, on voit de fins bacilles Gram-négatifs, les cultures aérobies et anaérobies ne donnent qu'un *Proteus*. Etant donné le long délai qui a séparé le prélèvement de la culture et l'augmentation consécutive des risques de souillure, des réserves doivent être faites sur l'importance à accorder à ce germe, dont on ne retrouvera d'ailleurs plus trace par la suite.

Quinze jours après le premier examen, nouveau prélèvement de pus pleural ; à l'examen direct on voit de rares bacilles Gram-négatifs, fins, isolés ou en amas. Les cultures aérobies sont négatives ; les cultures anaérobies, en milieu V. F., donnent un germe Gram-négatif (n° 1801).

Huit jours plus tard, soit vingt-trois jours après le premier examen, nouveau prélèvement. Pas de germes visibles à l'examen direct, les cultures aérobies sont négatives, les cultures anaérobies en milieu V. F. permettent d'isoler un germe Gram-négatif (n° 1833).

Les conditions locales ne permettant pas l'étude complète des germes anaérobies, les 2 souches sont adressées au D<sup>r</sup> A.-R. Prévot, à l'Institut Pasteur de Paris, qui identifie :

Le germe 1801 comme un *Spherophorus glycolyticus*, espèce nouvelle, décrite le 14 décembre 1951 par Tardieux et Ernst (1) ;

Le germe 1833 comme une *Ristella pseudo-insolita*, Beerens et Aladame 1949, variété sérophile.

L'intérêt de cette observation ne réside pas seulement dans la rareté des espèces décrites, ni même dans leur nouvelle localisation géographique, celle-ci ne faisant que confirmer le cosmopolitisme, l'universalité de la flore endogène des anaérobies de l'homme, elle réside aussi dans la diversité des espèces rencontrées.

L'isolement de germes variés à partir d'un pus pleural n'est pas un fait nouveau et nombreuses sont les observations ou dans un même prélèvement plusieurs germes anaérobies ont pu être identifiés. Dans ce cas la succession des isollements est particulièrement intéressante, il

(1) P. Tardieux, *Ces Annales*, 1951, 80, 275.

semble que l'on assiste à une sélection des germes par la thérapeutique antibiotique.

Dès le premier examen, on constate bien la présence de bacilles Gram-négatifs, mais seuls poussent des cocci aérobies et anaérobies. Ceux-ci seront les premiers à disparaître, ils ne seront plus retrouvés par la suite. Au deuxième examen ne pousse qu'un *Proteus* ; il n'est pas possible de décider s'il provient d'une souillure ou s'il fait partie de l'association primitive, lui non plus ne sera pas retrouvé. Dans les deux derniers prélèvements enfin, seuls des anaérobies stricts poussent. Il est possible que l'examen d'un plus grand nombre de colonies isolées apparemment semblables et leur étude complète aient permis dans ces deux prélèvements de mettre en évidence la présence des deux germes associés, c'est une hypothèse qui ne peut être exclue. Cependant, il est certain que dans le premier examen les colonies de *Spherophorus* dominaient comme celles de *Ristella* le faisaient dans le second, puisque l'étude de plusieurs colonies de chaque prélèvement n'a donné qu'une espèce dans chaque cas.

Il s'est donc produit, *in vivo*, une sélection, vraisemblablement par élimination des germes les plus sensibles à la thérapeutique. Les antibiotiques qui, si souvent, gênent le laboratoire pour l'isolement d'un germe, ont largement contribué ici à mettre en évidence des espèces dont le rôle habituel doit être assez discret lorsqu'il sont en butte à la concurrence microbienne de germes plus actifs.

CONCLUSIONS. — L'isolement à Saïgon dans un pus de pleurésie purulente de deux espèces anaérobies peu communes, *Spherophorus glycolyticus* et *Ristella pseudo-insolita* permet de souligner :

L'ubiquité des espèces anaérobies parasites de l'homme ;

Le rôle favorisant que peut avoir une thérapeutique antibiotique pour la mise en évidence des anaérobies dans une flore complexe ;

La grande valeur de la technique d'isolement en gélose V. F. glucosée.

## INFLUENCE DE LA RÉDUCTOSE SUR LE COMPORTEMENT DES BACTÉRIES AÉROBIES VIS-A-VIS DES ANTIBIOTIQUES

par J. MEYER, J. MALGRAS et J.-C. POTIN.

(Laboratoire de Microbiologie. Faculté de Pharmacie. Strasbourg.)

Depuis quelques années on emploie pour la culture des Bactéries anaérobies un sous-produit de brasserie dénommé « Réductose » dont J. de Clerck [1] fut le premier à indiquer le rôle dans la protection de la bière contre ses maladies par abaissement du rH.

Par la suite, A.-R. Prévot [2] préconisa l'emploi de cette substance dans la culture des anaérobies à l'air libre.

Enfin Moureau [3] publia une étude systématique et complète sur l'influence de la réductose dans la culture des anaérobies à l'air libre. En ce qui concerne l'hémoculture, cet auteur pense que l'addition de réductose au bouillon rend l'hémoculture totale d'emblée, « la réductose n'ayant aucune action empêchante sur les germes aérobies ».

L'action de ce facteur faisant l'objet de recherches au laboratoire, il nous a paru intéressant de poursuivre des investigations en vue de déterminer de façon plus précise ce qu'il fallait penser de l'emploi de la réductose dans les hémocultures et plus particulièrement dans l'épreuve de résistance des bactéries aérobies aux antibiotiques, épreuve qui, actuellement, est bien souvent le but de cette hémoculture.

Dans ces essais nous avons utilisé la méthode de Heatley dite d'Oxford en pratiquant les cultures sur milieu solide de Nitti et Martin préconisé par Sartory et Meyer [4].

Ces essais ont été divisés en deux parties.

I. *Action directe du mélange antibiotique + réductose sur différents germes.* — Nous coulons une petite quantité du milieu dans des boîtes de Petri stériles de façon à obtenir une couche mince ; après solidification et dans un deuxième temps, on recouvre cette première couche d'une mince pellicule du même milieu ensemencé à 40° au moyen de quantités égales d'émulsions en soluté physiologique des différents germes expérimentés.

Une fois le milieu refroidi, nous avons disposé avec précaution et sans les enfoncer dans la gélose deux anneaux de Heatley stériles dans chaque boîte. On a introduit dans l'une I goutte de solution d'antibiotique de titre connu et dans l'autre le même volume d'antibiotique additionné de I goutte de réductose. Pour se placer dans les mêmes conditions de volume, dans le premier anneau on a ajouté I goutte d'eau stérile. Après deux heures de séjour à la glacière, pour assurer la diffusion des liquides dans le milieu, nous avons abandonné les boîtes pendant vingt-quatre heures à l'étuve à 37°.

Le tableau qui suit exprime pour les souches sensibles utilisées, les dimensions en millimètres des zones de lyse correspondantes obtenues

ANTIBIOTIQUE	BACTÉRIE	ZONES DE LYSÉ (diamètres en millimètres)	
		Antibiotique + Réductose	Antibiotique seul
Pénicilline.	<i>B. subtilis</i> (2,5 U.O./cm <sup>3</sup> ) . . . . .	11	16
	<i>Staphylococcus aureus</i> (5 U.O./cm <sup>3</sup> ) . . . . .	19	24
Dihydro- streptomycine (10 000 U./cm <sup>3</sup> ).	<i>B. subtilis</i> . . . . .	22	22
	<i>Escherichia coli</i> . . . . .	19,5	14,5
	<i>Staphylococcus aureus</i> . . . . .	18	18
	<i>K. pneumoniae</i> . . . . .	25	25



en présence de pénicilline et de dihydro-streptomycine seules ou additionnées de réductose.

Pour plus de sûreté nous avons contrôlé les résultats obtenus en utilisant la méthode au Vitastain mise au point au laboratoire par J. Meyer et Chambet [5]. Les résultats obtenus ont été, dans tous les cas, superposables aux précédents.

II. *Action de l'antibiotique sur différents germes cultivés en présence de réductose.* — Dans ce cas il ne peut intervenir d'inhibition directe de l'antibiotique par un produit réducteur, en l'espèce la réductose. Pour nous placer dans les mêmes conditions que dans l'hémoculture selon la technique de Moureau, nous avons pratiqué nos essais en ajoutant 1/10 de réductose au milieu liquéfié et ceci juste avant l'ensemencement.

Pratiquement, afin de pouvoir comparer d'une façon plus précise l'action des antibiotiques, nous avons utilisé l'artifice suivant :

Sur la couche de milieu stérile et avant son complet refroidissement, nous avons disposé diamétralement une baguette de verre délimitant deux zones en demi-cercle de même superficie ; puis, après solidification complète, nous avons recouvert l'une des zones d'une légère couche de milieu réductosé ensemencé. Après quelques minutes de séjour à la glacière, on retire la baguette au moyen de pinces flambées et on complète la boîte avec le milieu sans réductose, mais ensemencé de façon identique. Le reste de l'opération s'effectue comme plus haut.

On a ainsi obtenu des boîtes de surface uniforme, permettant l'étude de l'action d'un certain nombre d'unités de pénicilline et de dihydro-streptomycine sur un germe cultivé sur les deux milieux différents. Les souches mises en expérience sont les mêmes que précédemment et les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau qui suit.

ANTIBIOTIQUE	GERME	MILIEU réductosé	MILIEU simple
Pénicilline.	<i>B. subtilis</i> (2,5 U. O./cm <sup>3</sup> ). . . . .	48	46
	<i>Staphylococcus aureus</i> (5 U. O./cm <sup>3</sup> ). . . . .	27,5	24
Dihydro-streptomycine (10 000 U./cm <sup>3</sup> ).	<i>B. subtilis</i> . . . . .	28	22
	<i>E. coli</i> . . . . .	20	14,5
	<i>K. pneumoniae</i> . . . . .	36,5	25
	<i>St. aureus</i> . . . . .	22	18

L'examen des deux tableaux montre que l'action de la pénicilline est diminuée par addition de réductose, alors que celle de la dihydro-streptomycine n'est pas perturbée, sauf vis-à-vis du colibacille qui se trouve, au contraire, plus fortement lysé.

Par contre, lorsque la réductose est introduite dans les milieux de culture, elle augmente nettement la sensibilité des germes aux deux antibiotiques utilisés. L'épreuve de résistance aux antibiotiques après hémoculture sur milieu réductosé, pour les bactéries aérobies, ne donnerait donc pas une idée exacte de la résistance véritable de ces bactéries aux antibiotiques.

Nous avons réalisé un essai supplémentaire ; après culture sur milieu réductosé, nous avons repris les bactéries qui ont été ensemencées sur milieu de Martin et Nitti sans réductose ; l'essai de résistance aux antibiotiques s'est alors montré en tous points identique à celui effectué au moyen de bactéries n'ayant jamais été cultivées sur milieu réductosé. Un simple repiquage élimine donc l'action de sensibilisation des bactéries aux antibiotiques par la réductose.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. DE CLERCK. *C. R. du IV<sup>e</sup> Congrès internat. de Microb.*, 1947, 535.
- [2] A.-R. PRÉVOT. *Ces Annales*, 1948, 75, 77.
- [3] MOUREAU. *Thèse de Médecine*, Paris, 1949.
- [4] A. et R. SARTORY et J. MEYER. *Microbiologie pratique*, Maloine, Paris, 1950, 535.
- [5] J. MEYER, R. SARTORY, J. TOUILLIER et R. CHAMBAT. *Bull. Assoc. dipl. Microb., Fac. Nancy*, mai 1951, 16.

## TROIS SOUCHES DE *SHIGELLA BOYDII* APPARENTÉES A UN TYPE PRÉCÉDEMMENT DÉCRIT

par D. PIÉCHAUD et M<sup>me</sup> S. RUBINSTEIN.

(Service de Microbie générale de l'Institut Pasteur.)

Dans une note précédente [1] nous décrivions un nouveau type antigénique de *Sh. boydii* isolé à Madagascar (souches D 15 et D 21). De ce germe nous rapprochons aujourd'hui 3 souches isolées à Hanoï l'année dernière par le Dr Kirche chez des malades présentant un syndrome dysentérique complet avec émission de glaires muco-sanglantes contenant le germe en quantité très importante.

C'est un bacille Gram-négatif, immobile ayant tous les caractères morphologiques et biochimiques des *Shigella* : colonies rondes régulières sur gélose inclinée et, en bouillon, trouble uniforme avec des ondes moirées. Ces souches n'utilisent ni urée ni citrate. Le lait et le petit-lait tournesolés, neutres les trois premiers jours qui suivent l'ensemencement, sont ensuite alcalinisés lentement. Nos souches ne produisent pas d' $\text{SH}_2$ , mais elles donnent en vingt-quatre heures une quantité importante d'indole. Nous insistons sur cette production d'indole qui est le seul caractère biochimique marquant, séparant ces souches de celles précédemment décrites [1].

Leur action sur les hydrates de carbone est la même que celle des souches D 15 et D 21 : lactose, saccharose et dulcité ne sont pas attaqués ; glucose et mannite sont utilisés en vingt-quatre heures. Deux souches, H 70 et H 21582 acidifient le maltose en sept jours. H 843 ne l'attaque pas alors que les germes de Madagascar viraient le milieu en vingt-quatre heures, de même l'action sur la sorbite est tardive pour les

souches d'Hanoï ; vis-à-vis du xylose elles se comportent comme D 15, en utilisant ce glucide tardivement (huit jours) tandis que D 21 ne modifiait pas ce sucre.

En résumé, ces souches ont les caractères biochimiques de la *Shigella* déjà décrite à trois exceptions près : elles donnent de l'indole en vingt-quatre heures, elles utilisent lentement ou pas du tout maltose et sorbite.

Aucun des sérums anti-dysentériques classiques n'agglutine nos trois souches, qu'on utilise une émulsion vivante, formolée ou bouillie, mais toutes trois sont agglutinées par le sérum anti-D 15 au 1/200 (le taux de ce sérum est de 1/800 pour la souche homologue). Nous avons préparé un sérum anti-H 21582 qui agglutine H 21582 et H 70 à 1/1 600, H 843 à 1/800 et les souches D 15 à 1/100 et D 21 à 1/200.

Par absorption croisée on fait disparaître l'antigène commun à ces deux groupes de souches, en gardant un antigène spécifique. En effet, on voit d'après le tableau que l'absorption du sérum anti-D 15 par H 21582 ne réduit que de moitié le taux d'agglutination de la souche homologue. Si l'absorption du sérum anti-H 21582 par D 15 réduit au contraire beaucoup la quantité d'agglutines spécifiques, le taux reste cependant de 1/100.

SOUCHES	SÉRUM anti-D 15	SÉRUM anti-H 21582	SÉRUM anti-D 15 absorbé par H 21582	SÉRUM anti-H 21582 absorbé par D 15
D 15 . . . . .	1/500	1/100	1/400	
D 21 . . . . .	1/1 600	1/200	1/200	
H 21582. . . . .	1/200	1/1 600		1/100
H 70 . . . . .	1/200	1/1 600		1/200
H 843. . . . .	1/200	1/800		1/100

Nous pensons donc que nos trois nouvelles souches ont assez de caractères communs pour être classées dans le même type que celles de Madagascar, puisqu'elles ont un antigène commun représentant une part importante (au moins la moitié) des antigènes, l'autre fraction étant constituée par un antigène spécifique.

Nous avons insisté sur ce nouveau groupe de germes en raison de sa répartition géographique qui semble assez diffuse, puisque certaines de nos souches ont été isolées à Madagascar, d'autres en Indochine et que des germes identiques ont été isolés en Italie par le Dr W. H. Ewing [2] qui a eu l'amabilité de nous en faire part.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] M<sup>me</sup> S. SZTUM-RUBINSTEIN, D. et M. PIÉCHAUD et R. NÉEL. Ces *Annales*, 1950, **78**, 146.  
 [2] W. H. EWING et G. A. CHAMBLEE. Communication personnelle.

## **SALMONELLA**

### **DANS LES GANGLIONS MÉSENTÉRIQUES DE PORCS**

par R. BUTTIAUX, R. GAUMONT et P. MOREL.

(*Institut Pasteur de Lille.*)

En dehors des typhoïdes et paratyphoïdes, les salmonelloses dites « toxi-infections alimentaires » sont exceptionnellement d'origine hydrique. Elles proviennent de l'absorption d'autres aliments contaminés. Un récent travail de Felsenfeld, Young et Yoshimura [1] vient confirmer cette opinion généralement admise. Parmi les viandes responsables, celles de porc contiennent des *Salmonella* beaucoup plus souvent que celles d'autres animaux. Felsenfeld et coll. [1] les trouvent dans 13,5 p. 100 des viandes et abats de porc, alors qu'ils ne les isolent que dans 0,2 p. 100 de ceux des bœufs.

Tous les auteurs s'étant intéressés à cette question signalent que c'est dans les ganglions mésentériques qu'il est le plus facile et le plus fréquent de trouver les *Salmonella*. En procédant ainsi, Clarenburg, Vink et Huisman [2] en isolent 14 d'espèces différentes chez 503 porcs apparemment sains. Hauser, Trenting et Breiffeth [3] trouvent *S. berta* (elle était à l'origine d'une intoxication alimentaire collective) dans un ganglion mésentérique de porc. L. et S. Le Minor et R. Néel [4] y découvrent de même *S. tananarive* (espèce nouvelle).

Nous nous sommes livrés aux mêmes recherches dans le Nord de la France. Nous avons examiné les ganglions mésentériques de 147 porcs sacrifiés dans l'abattoir d'une de nos grandes villes. Tous nos animaux avaient, au préalable, été soumis à un examen vétérinaire de contrôle et reconnus sains. Ils proviennent d'élevages des Flandres françaises.

*Technique.* — 1° Aussitôt après le sacrifice de l'animal, on prélève le plus aseptiquement possible, quelques ganglions mésentériques ; ils sont recueillis dans un flacon stérile.

2° Transportés rapidement au laboratoire, ils sont débarrassés avec des instruments stériles, de leur graisse, et flambés.

3° Ils sont broyés avec du sable stérile. Le broyat est repris par un peu d'eau distillée etensemencé largement sur milieu d'enrichissement au sélénite acide de sodium. Celui-ci est incubé à 37° durant vingt-quatre à trente-six heures. La portion profonde du tube est isolée en stries sur S.S. agar.

4° Les colonies suspectes (lactose : O) sont soumises au test d'uréase rapide de Elek [5] ; celles n'hydrolysant pas l'urée sont repiquées sur milieu de Kligler. Les souches présentant les caractères des *Salmonella* sont, après isolements successifs de purification, soumises aux études biochimique et antigénique.

Ce procédé de recherche des *Salmonella* est d'ailleurs employé dans notre service d'Hygiène alimentaire de l'Institut Pasteur de Lille



pour tous les produits suspects. Nous avons presque complètement abandonné le milieu de Muller-Kauffmann au tétrathionate de sodium. Il nous donnait des résultats incomparablement inférieurs à ceux obtenus avec le sélénite acide de sodium. Nous nous rangeons complètement à l'opinion de Cruickshank et Smith [6] qui font la même remarque.

Nous avons trouvé six fois des *Salmonella* dans les ganglions mésentériques des 147 porcs examinés, soit dans 4,08 p. 100 des cas. Les espèces isolées se décomposent ainsi :

*S. bareilly* : 3.

*S. typhi murium* : 2.

*S. newport* : 1.

Ces résultats appellent quelques commentaires :

1° Le pourcentage des porcs apparemment sains, porteurs de *Salmonella*, est fort dans les élevages des Flandres françaises. Il est supérieur à celui trouvé dans les Pays-Bas par Clarenburg et coll. [2] : 2,78 p. 100. Il est très inférieur cependant à celui rapporté par Felsenfeld et coll. [1] : 13,5, aux U. S. A.

2° La viande de porc constitue donc une source de contamination humaine, dont l'importance ne doit pas être négligée. Il faut remarquer que nos travaux, comme ceux d'ailleurs des auteurs étrangers signalés ici, concernent des animaux ayant été préalablement soumis à l'inspection vétérinaire. Felsenfeld et coll. [1] trouvent beaucoup plus souvent des *Salmonella* dans les viandes et abats de porc quand il s'agit de carcasses incontrôlées ; le pourcentage des cas positifs passe alors de 13,5 à 26,8.

Comme on le sait, un examen macroscopique vétérinaire, même le plus sérieux possible ne permet pas l'identification des animaux porteurs sains de *Salmonella*. Cette viande dangereuse pour l'homme ne peut pas être différenciée d'autres absolument saines. On en arrive donc à se demander si l'examen bactériologique des viandes n'est pas la seule mesure capable d'éviter le danger réel représenté par ces produits.

3° Il était intéressant de rechercher l'incidence possible du phénomène constaté par nous chez le porc, sur les salmonelloses humaines de la région du nord de la France alimentée par les produits provenant de l'abattoir étudié. *S. typhi murium* est la *Salmonella* d'intoxication alimentaire la plus fréquente dans notre région ; nous l'avons déjà signalé [7]. Cependant, dans toutes les toxi-infections collectives provoquées par elle, nous avons pu démontrer que l'élément contaminant était un porteur de germes humain. Nous reviendrons par ailleurs sur cette importante question. *S. newport* est exceptionnelle dans le nord de la France. Par contre, *S. bareilly* doit, ici, retenir notre attention. Alors qu'en 1947-1948-1949, nous ne l'avions isolée qu'une fois parmi 247 *Salmonella*, d'origine humaine, nous venons de la rencontrer trois fois parmi les 28 d'espèces différentes, découvertes chez l'homme durant les quatre premiers mois de 1951. Sa fréquence augmente donc considérablement dans notre région. On sait qu'elle se rencontre souvent dans les volailles, et l'un de nous [8] l'a signalée chez un poussin d'un élevage du nord de la France. Edwards, Bruner et Moran [9], considèrent que les volailles sont le plus important

réservoir de *Salmonella* et qu'une haute incidence d'une espèce déterminée chez celles d'une région précise, est accompagnée par sa haute fréquence chez l'homme de la même zone territoriale. Cependant, pareil phénomène n'a pas été constaté chez nous, jusqu'à présent. Par contre, dans deux de nos intoxications par *S. bareilly*, l'infection humaine a pu être produite par de la viande de porc (saucisses), sans que nous en ayons cependant la preuve biologique.

Il faut donc retenir le rôle étiologique possible et probable de la viande et des abats de porc dans les salmonelloses humaines. Le seul remède recommandable est le renforcement du contrôle des viandes ; il a déjà été demandé par Boyer et Tissier [10]. Pour être efficace, il nécessiterait un examen bactériologique des produits avant leur mise en vente ; pareille mesure nous semble difficilement réalisable en pratique. Le mieux, donc, est, pour le moment, d'éviter la consommation de viandes et abats de porc crus ou insuffisamment cuits.

Nous remercions MM. Poulain et Auffrant, docteurs vétérinaires chargés de l'inspection des viandes, qui nous facilité ces recherches. Nous remercions également M. Le Minor qui a bien voulu nous apporter son concours pour l'étude antigénique des *Salmonella* isolées.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] O. FELSENFELD, V. M. YOUNG et T. YOSHIMURA. *J. Amer. veter. med. Assoc.*, 1950, **116**, 17.
- [2] A. CLARENBURG, H. K. VINK et W. HUISMAN. *Tijdschr. v. Diergeneesk.*, 1949, **74**, 127.
- [3] G. HAUSER, W. TRENTING et L. BREIFFETH. *Publ. Health Rep.*, 1945, **60**, 1138.
- [4] L. et S. LE MINOR et R. NEEL. *Ces Annales*, 1949, **77**, 198.
- [5] S. D. ELEK. *J. Path. Bact.*, 1948, **60**, 183.
- [6] J. C. CRUIKSHANK et H. WILLIAMS SMITH. *Brit. med. J.*, 3 décembre 1949, 1254.
- [7] R. BUTTIAUX, L. LE MINOR et A. KESTELOOT. *Ces Annales*, 1950, **78**, 147.
- [8] R. GAUMONT. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1950, **3**, 140.
- [9] P. R. EDWARDS, D. W. BRUNER et Alice B. MORAN. *J. inf. Dis.*, 1948, **83**, 220.
- [10] J. BOYER et M<sup>lle</sup> TISSIER. *Presse Médicale*, 1949, **70**, 1028.

### ÉTUDE COMPARATIVE D'UN BACILLE ACIDO-RÉSISTANT ISOLÉ PAR CULTURE D'UN LÉPROME HUMAIN ET DU BACILLE DE HANSEN

par SŒUR MARIE-SUZANNE, R. SOHIER et R. NOËL.

(Travail des Laboratoires de la P. F. de la Faculté Catholique de Lyon  
et de la Faculté de Médecine de Lyon.).

Pendant les trente années que l'un de nous (Sœur Marie-Suzanne) a consacrées à l'étude de la lèpre, plusieurs souches de bactéries ont été

isolées en partant de lépromes prélevés à différents stades de la maladie. Ces souches, chromogènes ou non, à alcool-acido-résistance plus ou moins stable, ne montraient ni dans leur morphologie, ni dans leur comportement chez les animaux d'expérience, de caractères assez proches de ceux du bacille de Hansen pour qu'elles méritent de retenir l'attention.

En 1949, nous avons repris des recherches à partir d'un malade présentant une lèpre lépromateuse typique avec multiples taches infiltrées sur le tronc et les membres. Les premiers symptômes dataient d'environ un an. Il n'avait eu comme traitement que deux séries de huit injections d'hydrochaulmoogréol et 2 g de cimédone.

La biopsie d'une lésion infiltrée du genou gauche fournit un fragment contenant de très nombreux bacilles acido-résistants, intra- et extra-cellulaires, polymorphes, mais en majorité longs et granuleux. Sur la coupe, aspect classique de la lèpre lépromateuse : un épithélium malpighien aminci et dépourvu de papilles ; une bande claire sous-épithéliale vierge de tout élément réactionnel, puis un filtrat lépromateux avec histiocytes surchargés de bacilles dispersés dans une nappe réactionnelle histo-lymphocytaire avec quelques cellules de Virchow.

Une parcelle de cette biopsie dépourvue de son épiderme est écrasée avec une pince hémostatique, émulsionnée en sérum physiologique ; mise dans un tube à essai, elle est gardée à la température ambiante.

Après six mois, les frottis de cette émulsion montrent des bacilles acido-résistants, polymorphes, certains courts, d'autres longs, granuleux, formant parfois comme des filaments anastomosés ; le tout fortement acido-résistant. Une partie de l'émission est ensemencée sur bouillon nutritif, sur milieu de Löwenstein et de Petragnani, et dans un ballon contenant 50 cm<sup>3</sup> de milieu de Sauton mis à l'étuve à 32°-35°.

Tous les tubes sont restés stériles. Sur le ballon de Sauton, après quatre mois à l'étuve, on remarque sur un côté un voile blanchâtre ayant l'aspect d'un champignon, sur l'autre côté, un voile plissé, couleur saumon, grimpant sur la paroi du récipient.

Les frottis du voile blanchâtre montrent un mycélium cyanophile avec des éléments acido-résistants. Le voile chromogène est une culture de bacilles longs, granuleux, acido-résistants avec quelques éléments cyanophiles.

Après plusieurs repiquages sur milieu de Sauton et de Petragnani, la culture de bacilles acido-résistants a pu être isolée et repiquée sur milieu de Sauton ; elle donne un voile chromogène, soit lisse, soit rugueux ; mais elle exige une quantité assez importante de milieu. Dans les premiers ensemencements, le milieu reste clair pendant longtemps, parfois plusieurs mois ; après plusieurs repiquages, le trouble apparaît entre le dixième et le quinzième jour, mais le voile n'est bien formé qu'après deux mois. Sur Petragnani, la culture commence à être visible vers le vingtième jour. Les bacilles ont une acido-résistance constante ; ils sont polymorphes, mais surtout longs et granuleux, parfois en forme de massues.

Cette expérience a été renouvelée trois fois avec des biopsies prélevées sur le même malade. Deux fois, les premiers ensemencements ont donné une culture mixte de bacilles acido-résistants et de germes de

souillure ; une fois la souche acido-résistante a été obtenue pure au départ (1).

Les bacilles ainsi isolés ont été inoculés par voie intrapéritonéale à un cobaye et n'ont provoqué aucune lésion décelable chez cet animal sacrifié dix mois après l'inoculation.

Inoculés dans la cavité principale de 60 *Galleria mellonella*, les bacilles ont été retrouvés jusqu'au soixantième jour après l'inoculation. Au trentième jour après l'inoculation, un papillon de *Galleria* broyé et ensemencé dans un ballon contenant 500 cm<sup>3</sup> de milieu de Sauton a donné une culture de bacilles acido-résistants.

Chez les rats blancs inoculés dans le testicule et dans la peau avec cette souche, les bacilles ont été retrouvés et recultivés après vingt-quatre heures, quatorze jours, un mois, quatre mois, dix mois ; et, après un deuxième passage de rat à rat, il a été possible de les retrouver et de les cultiver quatre mois après l'inoculation.

Toutes ces souches sont entretenues sans difficulté sur milieu Sauton et Petragnani, à condition d'avoir un volume de milieu suffisant.

Inoculés à plusieurs séries de rats blancs avec passages successifs, ces bacilles n'ont montré aucun signe de toxicité ; mais les lésions histologiques retrouvées chez tous ces animaux dans les prélèvements faits à différentes périodes allant de vingt-quatre heures à douze mois après inoculation, rappellent exactement celles vues chez les rats inoculés avec des bacilles de Hansen obtenus à partir de broyats de lésions lépromateuses humaines. Les caractères des modifications histopathologiques constatées seront exposées dans un autre travail.

Sur la membrane chorio-allantoïdienne de poulet incubé dix jours, l'inoculation de 1 goutte de culture sur Sauton a déterminé une réaction de la membrane au point d'inoculation avec pénétration des bacilles dans les cellules mésenchymateuses ; l'embryon était encore vivant huit jours après l'inoculation.

Avec une culture sur Petragnani, nous avons préparé un antigène selon la méthode de Mitsuda. Cet antigène a donné une réaction très positive chez tous les lépreux lépromateux ou tuberculoïdes et chez une infirmière travaillant dans une léproserie, mais n'ayant pas la lèpre.

Pour nous rapprocher davantage des conditions de la réaction de Mitsuda, nous avons prélevé, sur un malade lépromateux, le nodule causé par l'intradermo-réaction avec l'antigène culture, et nous avons refait un antigène. Les intradermo-réactions pratiquées avec cette dernière préparation ont été négatives sur 10 malades lépromateux et positives sur 3 malades de formes tuberculoïdes ; mais cette dernière réaction n'a duré que quatre ou cinq jours.

*Conclusions.* — En laissant séjourner à la température ambiante dans du sérum physiologique un fragment de léprome riche en bacilles et préalablement écrasé, et en ensemencant le produit de cette macération en milieu de Sauton, nous avons obtenu une culture de germes présentant les caractères essentiels suivants :

(1) La même technique appliquée à des biopsies prélevées sur 2 autres malades en traitement par les sulphones depuis six mois ne nous a pas encore donné des résultats positifs.



Il s'agit d'un bacille polymorphe avec prédominance d'éléments longs et granuleux presque toujours groupés en amas, acido-résistants, Gram-positifs.

Ce germe a pu être retrouvé chez la *Galleria* jusqu'à soixante jours après inoculation.

Après inoculation au cobaye, il n'a été constaté aucune manifestation morbide au cours des dix mois d'observation.

Chez les rats, il a provoqué des lésions identiques à celles causées chez ces animaux par inoculation du bacille de Hansen provenant de broyat de lésions cutanées humaines. Comme pour le bacille de Hansen, les lésions sont atténuées par passage de rat à rat.

On peut donc admettre qu'un certain nombre des caractères de ce germe le rapprochent du bacille de Hansen sans qu'il soit possible cependant de définir exactement sa position par rapport au bacille de la lèpre (2).

Les communications suivantes paraissent ou paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**Action tuberculostatique de la viomycine *in vitro* et *in vivo*,**  
par CH. GERNEZ-RIEUX.

**Les bactéries semi-résistantes au bactériophage,** par R. WAHL et  
M<sup>me</sup> L. BLUM-EMERIQUE.

**Démonstration, par l'épreuve des bactériophages Vi, d'une analogie physiologique entre les antigènes Vi présents chez des espèces bactériennes différentes,** par P. NICOLLE, G. RITA et M. HUET.

**Etude de l'action de la chloromycétine sur la multiplication du bactériophage,** par E. EDLINGER.

**Le déterminisme de la sporulation du *Bacillus megatherium*.**  
I. Effet de l'épuisement de l'aliment carboné en milieu synthétique, par N. GRELET.

**Remarques sur l'action hémolytique des sels de cuivre,** par M<sup>lles</sup> S. LAMBIN, S. BAZIN et A. SALAS.

(2) Nous avons demandé au Dr Penso, qui poursuit actuellement de très intéressantes et utiles recherches sur l'identification des mycobactéries, d'étudier cette souche avec les méthodes qu'il a proposées et, en particulier, au moyen de l'action de divers bactériophages. Ces études sont encore en cours ; mais les premières investigations ne permettent pas de classer ce germe comme appartenant à l'un des *Mycobacterium* non pathogènes qu'il a identifiés.

**Le titrage de la sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques insolubles dans l'eau**, par P.-J. COLETOS, M<sup>lle</sup> M.-J. LAROCHE et E. ORIOU.

**Microscopie électronique des corps de Negri dans la rage des rues. Méthode de repérage et d'examen des coupes histologiques au microscope électronique**, par P. LÉPINE et M<sup>lle</sup> O. CROISSANT.

**Contribution à l'étude du mécanisme de la réduction des nitrates en nitrites par quelques germes isolés du sol. Mise au point d'un dosage des nitrates**, par S. KAUFFMANN.

### LIVRES REÇUS

**Fred M. Huber.** — *Biophysical Research Methods*. Interscience Publishers Inc., New-York, 1950, 667 pages, dollars : 9,50.

Cet ouvrage s'adresse à ceux qui désirent s'initier aux principes et aux méthodes de recherches physico-chimiques dont l'emploi s'est désormais imposé en biologie. Il ne vise pas à faire des spécialistes, mais à apprendre aux travailleurs pourquoi ces méthodes sont employées, sur quels principes elles s'appuient et comment se servir des appareils.

L'ouvrage débute par un excellent chapitre de F. Uber qui renferme des conseils aux chercheurs et leur enseigne comment éviter des expériences inutiles ou qui ne conduisent à rien en leur rappelant les bases de la méthode et le fait que les instruments, si perfectionnés fussent-ils, ne servent à rien si l'expérience a été mal conçue. Sous une forme souvent humoristique et toujours empreinte d'un profond bon sens, l'auteur rappelle des règles essentielles qui ne devraient jamais être perdues de vue par tout chercheur. Regrettons à ce propos de ne pas voir dans la bibliographie citée, l'ouvrage fondamental de Claude-Bernard sur l'« Introduction à la Médecine expérimentale » dont il existe cependant une bonne traduction en anglais.

Les chapitres suivants, traités chacun par des spécialistes de la matière, exposent successivement les principes, méthodes et techniques de la mesure de pression osmotique, de la centrifugation, les mesures de la viscosité, de la température et de la calorimétrie, la lyophilisation, les mesures bio-électriques, l'électrophorèse, les ultra-sons, la microscopie spéciale, la microscopie électronique, la spectrographie, l'irradiation aux rayons X en tant que moyen de recherche, les électrons, les neutrons et les particules alpha, enfin les isotopes stables et ceux radio-actifs employés comme éléments marqueurs. Chacun des chapitres est clairement traité, illustré de nombreux schémas et traite de la théorie générale avec suffisamment d'indications pratiques pour permettre au travailleur qui n'est pas un débutant de se familiariser rapidement avec le fonctionnement des appareils indiqués. Des références succinctes, essentiellement de la littérature anglo-saxonne, terminent chaque chapitre.

L'ouvrage, destiné aux étudiants américains, passe sous silence la

plupart des travaux ou instruments européens, sans doute en dehors de leur sphère d'intérêt. On découvre aussi de surprenantes affirmations, comme cette phrase (p. 400) : « En Europe... plusieurs constructeurs ont dessiné et ont l'intention de construire des microscopes électroniques... tous ces instruments ont été dessinés depuis la fin de la guerre et relativement peu se trouvent dans les laboratoires... »

L'ensemble de l'ouvrage n'en est pas moins intéressant à consulter et renferme nombre d'indications pratiques qui pourront être utiles aux travailleurs.

P. L.

**Francisco Sosa Galicia.** — Estado actual de los Espiroquetales. *Thèse de Médecine*, Guatemala, 1948.

Revue générale sur la spirochétose, cet ouvrage présente en cinq parties :

1. Historique, nomenclature et classification des spirochètes ; 2. Tréponèmes ; 3. *Borrelia* ; 4. *Leptospires* ; 5. Conclusion. Pour chacune des espèces traitées, les caractères principaux morphologiques et pathogènes sont exposés avec précision, le diagnostic des spirochètes avec lesquels la confusion est possible est clairement et complètement donné. La bibliographie est assez complète, et par la conscience avec laquelle il a été rédigé et le soin donné à sa présentation, cet ouvrage s'élève nettement au-dessus de la classe habituelle des thèses de médecine.

P. L.

---



## AVIS

---

### II<sup>e</sup> CONGRÈS INTERNATIONAL DE BIOCHIMIE

---

Le II<sup>e</sup> Congrès International de Biochimie est prévu, à Paris, du 21 au 27 juillet 1952.

Le programme n'est pas encore définitivement fixé. Toutefois, le Comité d'Organisation a prévu l'étude de sujets biochimiques d'actualité, au cours de 7 colloques :

- 1<sup>o</sup> Biochimie des stéroïdes ;
- 2<sup>o</sup> Biochimie de l'hématopoïèse ;
- 3<sup>o</sup> Biogénèse des protéines ;
- 4<sup>o</sup> Cycles des acides tricarboxyliques ;
- 5<sup>o</sup> Métabolisme microbien ;
- 6<sup>o</sup> Mécanisme d'action des antibiotiques ;
- 7<sup>o</sup> Hormones protéiques et hormones dérivées des protéines.

Les communications portant sur d'autres problèmes biochimiques seront groupées en sections homogènes.

Quatre conférences générales seront confiées à des savants qualifiés.

Le programme provisoire avec les bulletins d'adhésion et l'indication de divers renseignements pratiques sera diffusé vers la fin de l'été, auprès des Sociétés de Biochimie, Départements et Instituts de Biochimie, etc.

Les auteurs de communications devront en adresser le titre avant le 1<sup>er</sup> mars 1952 et un résumé de moins de 200 mots avant le 1<sup>er</sup> avril 1952 au Secrétaire général : professeur J.-E. Courtois, 4, avenue de l'Observatoire, Paris (VI<sup>e</sup>).

---

*Le Gérant : G. MASSON.*